

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P DE MEDICINA VETERINARIA

**Evaluación molecular de Ehrlichia chaffeensis en
propietarios de caninos domésticos con Ehrlichiosis**

TESIS

para optar el título de Médico Veterinario

AUTOR

Luis Lam Sueline

Lima-Perú

2010

*Dedicada a todos los miembros del
Laboratorio de Patología Clínica y los
del Laboratorio de Virología, a mi
familia y amigos.*

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE FOTOGRAFÍAS	vi
I.	
INTRODUCCIÓN	1
II.	
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	
Taxonomía	4
2.2	
Morfología	5
2.3	
Aislamientos de <i>E. chaffeensis</i>	9
2.4	
Características Genéticas, Antigénicas y Fenotípicas	9
2.5	
Proteínas de Superficie de <i>E. chaffeensis</i>	11
2.6	
Patogénesis de la Ehrlichiosis por <i>E. chaffeensis</i>	12
2.6.1	
Ingreso del agente e invasión celular	13
2.6.1.1	
La Pared Celular de <i>E. chaffeensis</i> Carece de LPS y Peptidoglicanos	13
2.6.1.2	
Secuestro del Colesterol del Hospedero para Poder Sobrevivir	14
2.6.1.3	
Eventos Moleculares que Ocurren Durante la Internalización y Creación del Compartimento Replicativo	15
2.6.1.4	
Subregulación de la Generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)	18

2.6.1.5	Inhibición de la Apoptosis en la Célula Hospedera	19
2.6.1.6	El sistema de Dos Componentes [Two Component System (TCS)]	19
2.6.1.7	Activación de Citoquinas	20
2.7	Epidemiología	22
2.7.1	Ciclo de Vida	22
2.7.2	Vectores	23
2.7.3	Hospederos Reservorios	23
2.7.3.1	Los Caninos Domésticos Como Hospederos Reservorios	24
2.7.4	Estudios Epidemiológicos	25
2.7.4.1	Norte América	25
2.7.4.2	Sudamérica	25
2.7.4.2.1	Perú	27
2.7.4.3	Otras Partes del Mundo	27
2.8	Diagnóstico	28
2.8.1	Diagnóstico Clínico	28
2.8.1.1	Signos Clínicos	28

2.8.1.2	Anormalidades Hematológicas y Bioquímicas	29
2.8.1.3	Manifestaciones Severas o Inusuales	31
2.8.1.4	Infecciones Asintomáticas	33
2.8.1.5	Diagnóstico Diferencial	33
2.8.2	Diagnóstico Serológico	34
2.8.2.1	Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta (IFA)	34
2.8.2.2	Western Blot	35
2.8.3	Visualización de Mórulas	35
2.8.4	Amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	36
2.8.4.1	PCR anidada (Nested PCR)	37
2.8.4.2	Electroforesis en Gel de Agarosa	39
2.8.5	Aislamiento	40
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1	Lugar y Época de Ejecución del Estudio	41
3.2	Materiales	41
3.2.1	Propietarios	41

3.2.2	Materiales para Almacenamiento y Toma de Muestra	42
3.2.3	Materiales para la PCR anidada	42
3.2.4	Materiales para La Electroforesis en Gel de Agarosa	43
3.3	Métodos	43
3.3.1	Toma de Muestra	43
3.3.2	Separación de Leucocitos (Capa Flogística)	44
3.3.3	Extracción de ADN	44
3.3.4	PCR anidada (Nested PCR)	44
3.3.5	Electroforesis en Gel de Agarosa	46
3.4	Análisis de los Datos	48
IV.	RESULTADOS	49
V.	DISCUSIÓN	51
VI.	CONCLUSIONES	54
VII.	RECOMENDACIONES	55
VIII.	LITERATURA CITADA	57
IX.	ANEXO	70

RESUMEN

Ehrlichia chaffeensis es una bacteria intracelular obligatoria que pertenece a la familia *Anaplasmataceae* y es el agente causal de la Ehrlichiosis Monocítica Humana (EMH), una enfermedad con signos inespecíficos que se transmite en su mayoría mediante la mordedura de garrapatas de los géneros *Amblyomma*, *Dermacentor* y *Rhipicephalus* y mediante transfusiones sanguíneas de un individuo afectado a otro susceptible. En el presente estudio se detectó a través de PCR anidada, la frecuencia relativa de *E. chaffeensis* en propietarios de caninos domésticos con Ehrlichiosis. La toma de muestra se realizó en 20 distritos de la provincia de Lima y se encontraron muestras positivas en los distritos de Lurín, San Juan de Lurigancho, Comas, Chorrillos, Carabayllo y Ate, por lo que se concluye que *E. chaffeensis* está distribuida en pobladores de al menos seis distritos de la provincia de Lima. Se analizaron 60 muestras de sangre periférica y se encontraron diez positivos (10/60), lo que proporcionó una frecuencia relativa de 16.66%. El 80% (8/10) de las muestras positivas pertenecieron a individuos del sexo femenino y sólo el 20% (2/10) al sexo masculino.

Palabras clave: *Ehrlichia chaffeensis*, Ehrlichiosis Monocítica Humana, PCR, PCR anidada.

ABSTRACT

E. chaffeensis is an obligately intracellular bacteria in the family *Anaplasmataceae* and is the agent of the Human Monocytic Ehrlichiosis (HME), a disease with unspecific symptoms that is mainly transmitted through tick bites of the genera *Amblyomma*, *Dermacentor* and *Rhipicephalus*, and through blood transfusions from an infected to a sensitive person. In this study we detected a relative frequency of *E. chaffeensis* in owners of domestic canines with Ehrlichiosis using Nested PCR. The sampling was done in 20 districts of the province of Lima and we found positive samples in the districts of Lurín, San Juan de Lurigancho, Comas, Chorrillos, Carabaylo and Ate, so we came to the conclusion that *E. chaffeensis* is distributed in at least six districts of the province of Lima. We tested 60 peripheral blood samples and we found ten positive samples, this gives us a 16.66% relative frequency. 80% (8/10) of the positive samples belonged to females and 20% (2/10) belonged to males.

Key words: *Ehrlichia chaffeensis*, Human Monocytic Ehrlichiosis, PCR, Nested PCR.

LISTA DE CUADROS

Página

CUADRO N°1	Proteínas de Superficie de <i>E. chaffeensis</i> .	11
CUADRO N°2	Resultados a las Pruebas Moleculares (PCR anidada).	50

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA N°1	Frotís de sangre periférica de un paciente con EMH.	7
FIGURA N°2	Electromicrografía que muestra células reticulares y células densas de <i>E. chaffeensis</i> .	8
FIGURA N°3	Proteínas de superficie de la familia OMP 1/P28.	12
FIGURA N°4	Entrada mediada por balsas lipídicas, establecimiento y mantenimiento de “nichos” intracelulares de <i>E. chaffeensis</i> .	21
FIGURA N°5	Ciclo de Vida de <i>E. chaffeensis</i> .	22
FIGURA N°6	Metodología de la PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa).	38
FIGURA N°7	Aplicación de los productos de la PCR en los pocillos del gel en la cámara electroforética.	47

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

		Página
FOTOGRAFÍA N°1	Resultados de PCR en Gel de Agarosa al 1.5%	48

I. INTRODUCCIÓN

La Ehrlichiosis Humana es una enfermedad infecciosa de reconocimiento reciente en el país, que se transmite por garrapatas y que es causada por especies de la bacteria *Ehrlichia spp.* Esta bacteria es un microorganismo pleomórfico, cocoide, gram-negativo intracelular obligatoria, que reside dentro de vacuolas intracitoplasmáticas de células sanguíneas de animales y humanos. Pertenece al Orden Rickettsiales, Familia *Anaplasmataceae*, género *Ehrlichia* (Dumler *et al.*, 2001) y se multiplica por fisión binaria, formando un agregado o microcolonia (mórula), visible en frotis sanguíneo al microscopio óptico (Rikihisa, 2003; Tamí *et al.*, 2003).

El género *Ehrlichia* está conformado por *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia muris* y *Ehrlichia ruminantum* (Tamí *et al.*, 2003) y fue nombrado en honor al microbiólogo alemán Paul Ehrlich, que la describió por primera vez en Estados Unidos en 1945.

La enfermedad es transmitida en su mayoría por mordeduras de garrapatas pertenecientes a los géneros *Amblyomma* (Paddock *et al.*, 2001), *Rhiphicephalus* (Harrus *et al.*, 1999; Bremer *et al.*, 2005) y *Dermacentor* (Johnson *et al.*, 1998), mediante transfusiones sanguíneas de un individuo afectado a otro susceptible (Ristic y Holland, 1992; López *et al.*, 2003), y causa una gran gama de síntomas, los cuales van desde ser muy leves hasta causar la muerte.

En 1986 se describió el primer caso de Ehrlichiosis humana en Estados Unidos (Tamí *et al.*, 2004). Pero recién en 1991 se aisló y caracterizó a *Ehrlichia* como la causante de la Ehrlichiosis Monocítica Humana (EMH) (Anderson *et al.*, 1991).

Esta enfermedad infecciosa ha sido reportada en diversas especies animales [incluyendo aves (Rikihisa, 2003)] y el hombre (Yu *et al.*, 2006), siendo considerada una enfermedad zoonótica emergente de gran importancia en los países con climas tropicales y subtropicales (Greene, 1997). Los principales agentes infecciosos identificados en diversos países de América del Sur son *Ehrlichia canis* (Barros *et al.*, 2005; Vinasco *et al.*, 2007), *Ehrlichia chaffeensis* (López *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2006), *Anaplasma platys* (Abarca *et al.*, 2007) y *Anaplasma marginale*; todos éstos se han observado en caninos, por lo que sugiere que los perros pueden actuar como reservorios de los agentes de la Ehrlichiosis humana, lo que ha sido señalado por diferentes autores (Dawson *et al.*, 1996; Breitschwerdt *et al.*, 1998; López *et al.*, 2003).

El primer agente reportado en Perú del género Ehrlichia, fue *Ehrlichia canis*, causante de la Ehrlichiosis Monocítica Canina (Chavera *et al.*, 1982), que actualmente tiene un gran impacto en nuestro país (Vinasco *et al.*, 2007), llegando a tener en caninos seroprevalencias de 16.5% (Adrianzén, 2003) en Lima, hasta 76% en Sullana - Piura (San Miguel, 2006).

Recientemente (2008), en Perú se realizó el primer estudio en humanos que realizan actividades veterinarias (médicos veterinarios, técnicos de laboratorio, bañadores de perros, etc.) de Lima Metropolitana, en el que se ha identificado por serología (IFA) anticuerpos contra *Ehrlichia chaffeensis* (24.6%) y *Ehrlichia canis*

(29.2%) (Li, 2008). Además en el año 2009, Moro y colaboradores encontraron seroprevalencias de *E. chaffeensis* de 25%, 23%, 3 % y 3% en los departamentos de Piura, Cuzco, Lima e Iquitos, respectivamente. Por otro lado, el Instituto Nacional de Salud (INS) encontró una seroprevalencia de *E. chaffeensis* de 9.2% en el departamento de Ancash.

Por el momento no se conoce la epidemiología de esta enfermedad en nuestro país. No se sabe cuáles son los reservorios ni los vectores. Por lo que se necesita mayores estudios en esta enfermedad que no sólo afecta a caninos sino aparentemente a sus dueños y/o veterinarios.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Taxonomía

E. chaffeensis es una bacteria intracelular obligada de la familia *Anaplasmataceae* y es miembro de la subdivisión α -*Proteobacteria*. Hasta el año 2001, el género *Ehrlichia* estaba compuesto por diversas especies reconocidas, como *E. canis*, *E. phagocytophila*, *E. sennetsu*, *E. equi*, *E. risticii*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii* y *E. muris* (Paddock y Childs, 2003).

Estas especies demostraron tener una considerable diversidad molecular basada en un análisis filogenético de los genes ARNr 16S, proteínas de superficie, entre otras cosas. En base a estas diferencias, *Ehrlichia* spp. es recientemente separada en tres “genogrupos” informales (Dumler y Bakken, 1995). Una revisión taxonómica contemporánea reasigna a varias de estas especies a otros géneros (*E. sennetsu* y *E. risticii* al género *Neorickettsia* y *E. phagocytophila* y *E. equi* al género *Anaplasma*) y obliga al género *Ehrlichia* a incluir a *Cowdria ruminantum*, un patógeno transmitido por garrapatas emparentado cercanamente, que causa una enfermedad cardíaca severa (hidrocarditis) en rumiantes de África y el Caribe. En esta clasificación, todos los miembros de la tribu *Ehrlichieae* fueron reasignados a la familia *Anaplasmataceae* (Dumler *et al*, 2001).

Las bacterias que causan la Ehrlichiosis Humana están ahora representadas por tres géneros y ya no solamente por el género *Ehrlichia*; éstos incluyen a *Neorickettsia sennetsu* (el agente de la fiebre del sennetsu), *Anaplasma phagocytophilum*, *E. ewingii*, *E. canis* y *E. chaffeensis*. El nuevo género *Ehrlichia* incluye a *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* y *E. ruminantum*. Estas bacterias comparten varias características genéticas, morfológicas, clínicas y ecológicas; todas son 97.7% similares en sus secuencias del gen ARNr 16S, todas residen y se multiplican en vacuolas citoplasmáticas de las células hospederas (especialmente en leucocitos mononucleares y polimorfonucleares, y células endoteliales, dependiendo de la especie en particular); además todas causan enfermedades en animales, humanos o ambos; y todas son transmitidas por garrapatas duras (Dumler *et al*, 2001) .

2.2 Morfología

Las descripciones microscópicas y ultraestructurales de *E. chaffeensis* están basadas en la observación del patógeno en leucocitos y tejidos humanos, y en las diversas líneas celulares de origen mamífero. Estas bacterias son pequeñas y no motiles; éstas residen y crecen en vacuolas citoplasmáticas derivadas de un endosoma y forman agregados libres a condensados denominados mórulas (Paddock y Childs, 2003).

Al microscopio, estas mórulas tienen aspecto de moras, abultadas inclusiones intracitoplasmáticas que se tiñen de azul oscuro a morado con tinciones de tipo Romanovsky (Figura N°1) (Rikihisa, 1991). La microscopía electrónica identifica dos tipos de células morfológicas: formas cocoides y cocobacilares con ribosomas y núcleo con fibrillas de ADN uniformemente dispersadas a través del citoplasma (células

reticulares), y bacterias predominantemente cocoides con ADN nuclear condensado y ribosomas (células densas) (Figura N°2).

Las células reticulares miden 0.4 a 0.6 μm por 0.7 a 1.9 μm , y las células de núcleo condensado miden 0.4 a 0.6 μm de diámetro. Ambos tipos de células se replican por fisión binaria y tienen pared celular de tipo gram-negativa. Ambos tipos de células se han visto en muestras clínicas (Paddock *et al*, 1997), aunque la importancia microbiológica de las diferencias morfológicas es desconocida.

Una mórula puede medir de 1.0 a 6.0 μm de ancho y contiene 1 a más de 40 organismos de tipos de células uniformes o mixtas. El espacio intramorular puede contener una matriz fina, estriada y fibrilar, y túbulos intramorulares de 25 ηm de diámetro, que se originan de células reticulares de la membrana exterior. En cultivos celulares y células infectadas humanas, la mitocondria de la célula del hospedero está frecuentemente en los márgenes de las mórulas (Raad *et al*, 1989; Popov *et al*, 1995).

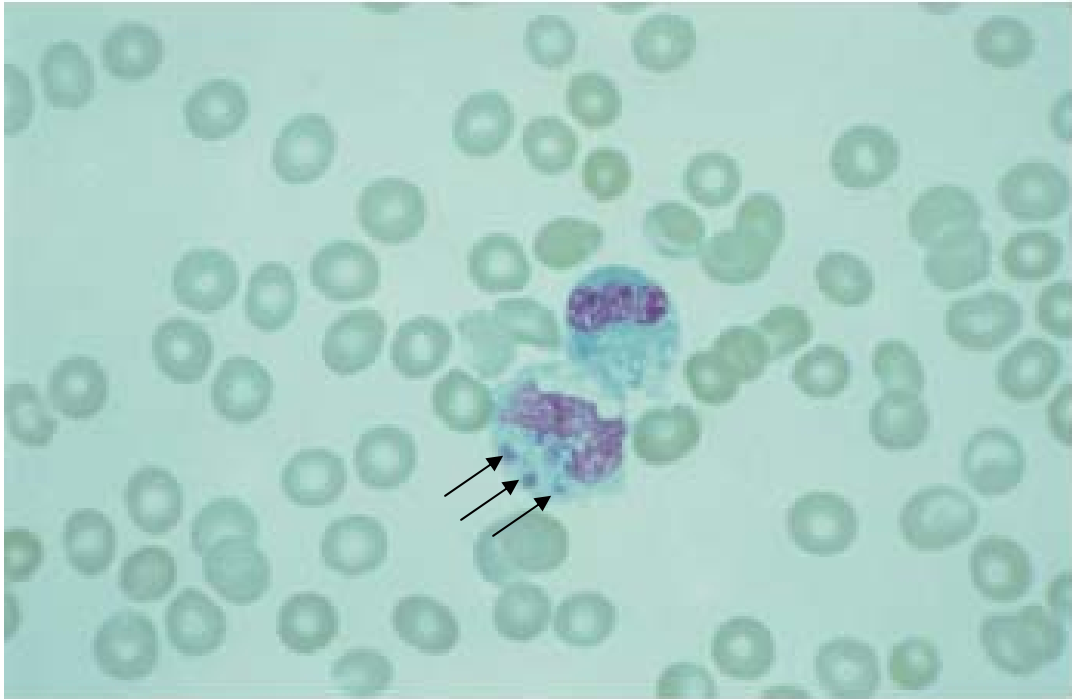


Figura N° 1: Frotís de sangre periférica de un paciente con EMH. Muestra inclusiones basofílicas (mórulas) de diversos tamaños en el citoplasma de un monocito (señaladas por las flechas). Cada mórula consiste de un grupo de *E. chaffeensis* contenido dentro de una vacuola. Tinción modificada de Wright. Magnificación 1000x. Tomado de Paddock y Childs, 2003.

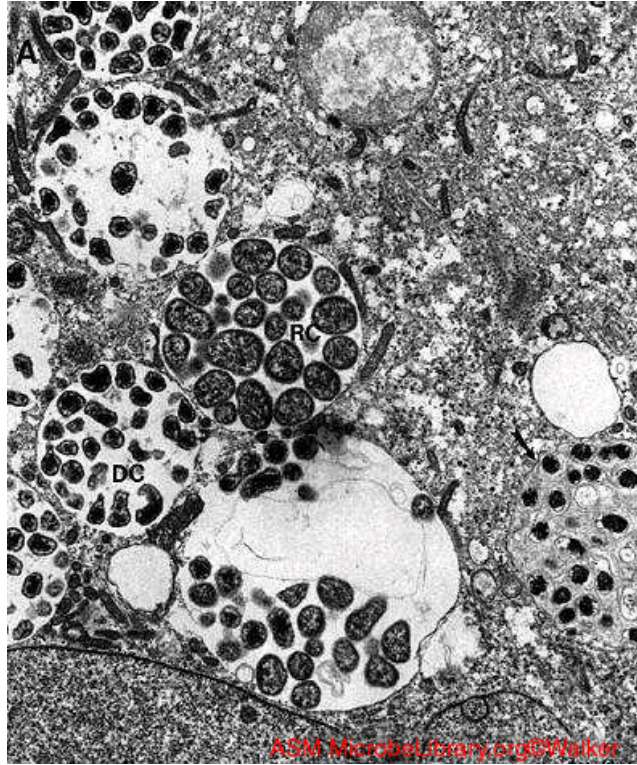


Figura N° 2: Electrofotomicrografía que muestra células reticulares (RC) y células densas (DC) de *E. chaffeensis* .
Autores: David Walker, Steve Dumler y Vsevolod Popov. 2002.

2.3 Aislamientos de *E. chaffeensis*

Al menos 21 aislamientos de *E. chaffeensis* se han obtenido de pacientes con EMH, infectados con cepas Arkansas (Dawson *et al*, 1991b; Dumler *et al*, 1995), Oklahoma (Chen *et al*, 1997a), Florida y Georgia (Paddock *et al*, 1997; Sumner y Childs, 1999), Tennessee (Standaert *et al*, 2000; Paddock *et al*, 2001), y Maryland (Tan *et al*, 2001). Los aislamientos fueron obtenidos en cultivos primarios usando una línea celular de histiocitoma canino (células DH82), y en menor frecuencia se utilizó fibroblastos pulmonares de embriones humanos (células HEL 299) (Dawson *et al*, 1991; Dumler *et al*, 1995; Chen *et al*, 1997; Lockhart *et al*, 1997; Dugan *et al*, 2000; Standaert *et al*, 2000; Paddock *et al*, 2001).

E. chaffeensis ha sido adaptada para crecer en varias líneas celulares *in vitro*, incluyendo células endoteliales microvasculares humanas (células HMEC-1), células renales de mono verde africano (células Vero), células de carcinoma epitelioide cervical humano (células HeLa), células de leucemia monocítica humana (células THP-1), células de embriones de ratones y fibroblastos murinos (Barnewall y Rikihisa, 1994; Brouqui *et al*, 1994; Chen *et al*, 1995; Heimer *et al*, 1998; McKechnie *et al*, 2000, Paddock y Childs, 2003).

2.4 Características Genéticas, Antigénicas y Fenotípicas

El genoma de *E. chaffeensis* mide aproximadamente 1250 kb (Rydkina *et al*, 1999), pero no ha sido caracterizado por completo. Dentro de las secuencias de nucleótidos caracterizadas están el gen ARNr 16S (Anderson *et al*, 1991), varios genes

codificadores de proteínas inmunoreactivas que incluyen a VLPT (Blanco de PCR de longitud variable) (Sumner *et al*, 1999), genes proteicos de 120 kDa (Yu *et al*, 1997), 106 kDa y 37 kDa (Yu *et al*, 1999), el operon de choque térmico *groESL* (Sumner *et al*, 1997), el gen de quinolato sintetasa A (Yu y Walter, 1997) , y un locus que contiene 22 genes homólogos pero no idénticos (la familia multigénica p28 o grupo OMP) (Yu *et al*, 2000; Ohashi *et al*, 2001).

Todas estas secuencias de nucleótidos le conceden a la bacteria la habilidad para variar genética, antigénica y fenotípicamente a nivel de células hospederas y de este modo evitar el sistema inmune. Una diversidad genética adicional es producida por diferencias en el orden lineal de repeticiones individuales y a través de diversas deleciones y sustituciones a lo largo del gen (Rikihisa *et al*, 2009) .

Hasta hace poco no se conocía si había diferencias patogénicas o biológicas entre las diferentes cepas de *E. chaffeensis*, pero Miura y Rikihisa en 2007 realizaron experimentos en ratones inmunosuprimidos inoculados con 3 diferentes cepas [la cepa Arkansas, Wakulla y Liberty (aislamientos en condados del estado de Florida)], y encontraron que el orden de severidad de signos clínicos y carga bacteriana detectado en los ratones era Wakulla, Liberty y por último Arkansas. Estos resultados revelan que existen diferentes fenotipos de virulencia entre las diversas cepas de *E. chaffeensis* y por lo tanto se presenta una patogenia diferente cada vez que una cepa distinta invade las células hospederas.

2.5 Proteínas de Superficie de *E. chaffeensis*

Ge y Rikihisa en el 2007, realizaron la caracterización de las proteínas de superficie, las cuales proveen una importante interfase para las interacciones patógeno-hospedero.

Cuadro N° 1: Proteínas de superficie de *E. chaffeensis*.

Proteína de Superficie	Masa Molecular (Da)	Probable Función
P28	30,552	Desconocida
P28-1	30,145	Desconocida
OMP-1N	30,671	Desconocida
OMP-1P	32,744	Desconocida
OMP-1E	30,647	Desconocida
OMP-1S	32,045	Desconocida
OMP-1V	30,921	Desconocida
OMP-1M	33,293	Desconocida
OMP-1A	33,113	Desconocida
OMP-1C	30,588	Desconocida
OMP-1D	33,718	Desconocida
OMP-1F	30,939	Desconocida
OMP-1H	33,177	Desconocida
OMP-1Q	33,584	Desconocida
OMP-1U	33,766	Desconocida
OMP-1W	31,870	Desconocida
OMP-1X	30,628	Desconocida
OMP-1Y	31,806	Desconocida
OMP-1Z	33,252	Desconocida
Proteína del sistema de secreción tipo IV VirB9-1	31,690	Transporte de macromoléculas a través de las membranas internas y externas de la bacteria
Dihidropicolinato reductasa	29,614	Biosíntesis de L-lisina y de paredes celulares bacterianas
Disulfide reductasa	27,606	Doblado de proteínas y procesos asociados
Antioxidante de la familia AhpC/Tsa	23,575	Reducción de peróxidos
Serina proteasa de la familia DO/DeqQ	50,740	Doblado de proteínas, degradación
Aminopeptidasa del citosol	54,708	Metabolismo
Deshidrogenasa, isocitrato, familia isopropilmalato	56,858	Biosíntesis de aminoácidos
gp47	33,040	Desconocida
GroEL (60 kDa)	58,850	Chaperonina
ATP sintasa F1, subunidad beta	54,933	Producción de energía
Familia OMP85	87,546	Ensamblaje de OMPs
ECH_0525	74,244	Desconocida
Proteína DnaK	69,080	Chaperona
Factor G	76,707	Síntesis de proteínas

Tomado de Ge y Rikihisa, 2007.

Se piensa que la proteína hipotética ECH_0525 puede tener una función transportadora. Por otro lado, se sospecha que las proteínas de superficie de 47, 55, 60, 75, 80, 90, 120 y 200 kDa pueden tener un rol en la unión e internalización en las células hospederas. De hecho se ha propuesto que gp47 y gp120 tienen una función de adhesinas durante la unión de las bacterias a las células hospederas (Ge y Rikihisa, 2007).

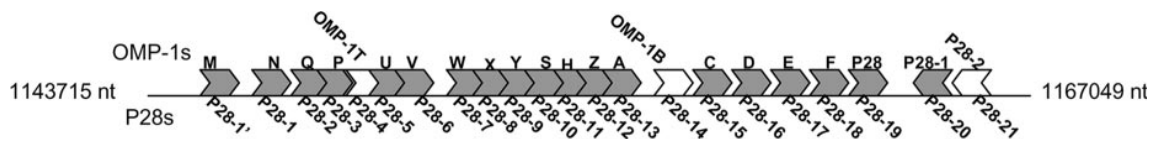


Figura N° 3: Proteínas de superficie de la familia OMP-1/P28. Las cajas grises son proteínas expuestas en la superficie. Las cajas blancas son proteínas que no son expuestas en la superficie. Tomado de Ge y Rikihisa, 2007.

2.6 Patogénesis de la Ehrlichiosis por *E. chaffeensis*

Una vez transmitida a los humanos, *E. chaffeensis* tiene la extraordinaria habilidad para tomar a las células inmunes de defensas de primera línea como sus sitios exclusivos de supervivencia. Las células más infectadas son los monocitos pero también se han observado en linfocitos, linfocitos atípicos, promielocitos, metamielocitos, neutrófilos abastados y segmentados (Paddock y Childs, 2003). Estas bacterias luego se replican en las inclusiones unidas a la membrana en el citoplasma del hospedero formando las mórulas. La célula infectada contiene típicamente 1 a 2 mórulas pero se pueden encontrar hasta 15 en pacientes inmunosuprimidos (Paddock y Childs, 2003; Rikihisa, 2003).

2.6.1 Ingreso del Agente e Invasión Celular

Los monocitos y macrófagos son células equipadas con poderosas defensas antimicrobiales innatas (Rikihisa *et al*, 2003). Además poseen receptores de superficie (TLRs) que reconocen patrones en las bacterias (PAMPs), que a su vez activan al sistema inmune para eliminar a los microorganismos invasores. Entonces, la duda es cómo es que *E. chaffeensis* puede introducirse y proliferar en las células blancas o de defensa. Los mecanismos no son completamente entendidos, pero si se sabe que hay diversas características que ha desarrollado esta bacteria para poder pasar desapercibida en el organismo del hospedero hasta poder proliferar y luego instalarse (Rikihisa *et al*, 2003).

2.6.1.1 La Pared Celular de *Ehrlichia chaffeensis* Carece de LPS y Peptidoglicanos

Los monocitos y macrófagos expresan receptores de superficie con patrones de reconocimiento, como los receptores tipo Toll (TLRs) y los dominios de oligomerización unidos a nucleótidos (NOD), los cuales contienen receptores intracelulares de proteínas que pueden reconocer y unirse a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) incluyendo a lipopolisacáridos (LPS) y peptidoglicanos. Estas uniones provocan respuestas inmunes innatas que generalmente eliminan a la mayoría de microorganismos del cuerpo humano (Rikihisa, 2009).

E. chaffeensis ha evolucionado, de manera que ha perdido todos los genes para la biosíntesis de LPS y casi todos los genes para la biosíntesis de peptidoglicanos, y por lo tanto este patógeno no desencadena una respuesta inmune innata efectiva (Rikihisa,

2003). Además, ésta sobrevive y se replica en las células del intestino medio y las glándulas salivares de la garrapata vector. Las células de los invertebrados también tienen fuertes mecanismos de defensa innata que responden a los PAMPs (Little *et al*, 2005). Por lo tanto, la pérdida de los genes para la biosíntesis de LPS y peptidoglicanos también facilita la adaptación de la bacteria a las células de la garrapata vector.

La pérdida de peptidoglicanos provee otros beneficios, le brinda a *E. chaffeensis* la flexibilidad para sobrevivir en el limitado espacio intravascular y la plasticidad requerida para que los leucocitos infectados puedan circular a nivel intravascular. Además la pérdida de estos genes explica la estructura inusual de esta bacteria, la cual es pleomórfica y está envuelta en una fina membrana externa ondeada que tiene un espacio periplásmico estrecho, y no hay evidencia de que tenga una capa capsular o pili (Rikihisa *et al*, 1997), por lo tanto, se cree que esta bacteria se une a las células hospederas a través de sus proteínas de membrana externa (OMP).

2.6.1.2 Secuestro del Colesterol del Hospedero para Poder Sobrevivir

E. chaffeensis es un agente muy sensible al estrés mecánico y es una bacteria pleomórfica gram-negativa. La incorporación de colesterol de la célula hospedera a la membrana del agente es esencial para bacterias frágiles y pleomórficas, y para micoplasmas, que carecen de pared celular (Dahl, 1993). Este agente carece de genes para la biosíntesis de Lípido A, por lo que ha evolucionado la habilidad para obtener colesterol de las células del hospedero (Lin y Rikihisa, 2003).

Se ha demostrado que esta bacteria contiene niveles significativos de colesterol en su membrana a través de técnicas como la microscopía fluorescente y análisis bioquímicos. El tratamiento de esta bacteria con un reactivo de extracción de colesterol causa cambios a nivel ultraestructural. Además el pre-tratamiento con un derivado fluorescente del colesterol resultó en la incapacidad de la bacteria para infectar las células hospederas, y por lo tanto en su muerte. La dependencia de este agente, al colesterol para la infección y supervivencia sugiere que los niveles de colesterol sanguíneos altos exacerban la severidad de la infección en mamíferos (Lin y Rikihisa, 2003; Rikihisa, 2009).

2.6.1.3 Eventos Moleculares que Ocurren Durante la Internalización y Creación del Compartimento Replicativo

La entrada de *E. chaffeensis* en las células hospederas es independiente de microfilamentos, es decir, no entra por fagocitosis, pero si es dependiente de actividad de transglutaminasas, las cuales son necesarias para que ocurra una endocitosis mediada por receptores (Lin *et al*, 2002). Un incremento del Calcio libre ($[Ca^{2+}]_i$) en el citoplasma del hospedero es esencial para que la bacteria pueda entrar en los monocitos y macrófagos. Esta bacteria induce el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ a través de los siguientes eventos de señalamiento: entrecruzamiento de proteínas por transglutaminasas, fosforilación de tirosinas, activación de la fosfolipasa C gamma 2 (PLC- γ 2) y la producción de IP₃ (Lin *et al*, 2002; Rikihisa, 2009).

La endocitosis mediada por caveolas o balsas lipídicas es un sistema de vesículas traficantes que sobrepasan las vías de los fagolisosomas, y por lo tanto es

utilizada por una gran variedad de microorganismos patógenos que entran a las células del hospedero (Lafont y van der Goot, 2005). La entrada de *E. chaffeensis* involucra a este sistema (Lin y Rikihisa, 2003).

Las balsas lipídicas son microambientes lipídicos especializados en las superficies celulares. Éstos son ricos en colesterol, proteínas ancladas al glicosilfosfatidilinositol (GAPs), gangliósidos de glicoesfingolípidos G_{MI} , y diversos tipos de proteínas de membrana involucradas en transducción de señales como receptores, transductores de señales y transportadores de membrana (Simona y Toomre, 2000).

Las caveolas se forman cuando las proteínas específicas de caveolas, las caveolinas, se acumulan (Anderson, 1998). Las caveolinas son proteínas integrales de la membrana plasmática que se unen fuertemente al colesterol. Las caveolas forman invaginaciones endocíticas y exocíticas únicas en las superficies de varios tipos de células y pueden importar moléculas a lugares específicos dentro de la célula o puede exportar moléculas a espacios extracelulares a través de un mecanismo dependiente de clatrina. Las caveolas también están implicadas en la compartimentalización de una gran variedad de actividades de señalamiento (Anderson, 1998; Simona y Toomre, 2000; Rikihisa, 2009).

Los GAPs se requieren para la internalización de *E. chaffeensis*. Mientras que la clatrina, una proteína involucrada en la endocitosis, nunca ha sido asociada a la internalización de esta bacteria (Barnewall *et al*, 1997; Lin y Rikihisa, 1997; Rikihisa, 2009). La caveolina-1 y las proteínas fosforiladoras de tirosina, incluyendo a la PLC-

$\gamma 2$, están localizadas junto con las inclusiones replicadoras tempranas y tardías de *E. chaffeensis* (Lin y Rikihisa, 2003b).

Es muy probable, que la unión de *E. chaffeensis* a receptores no identificados activen algunos receptores de tirosina kinasas, éstas a su vez fosforilan proteínas en caveolas. PLC- $\gamma 2$ es una de las proteínas presentes en las células hospederas infectadas por *E. chaffeensis*, que son rápidamente fosforiladas por tirosinas (Lin *et al*, 2002). A su vez el sustrato de PLC- $\gamma 2$, el 4.5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂), es también rico en caveolas (Galbiati *et al*, 2001). Las caveolas pueden facilitar la acción enzimática de PLC- $\gamma 2$, lo que conlleva a un incremento en los niveles intracelulares de Ca²⁺, el cual es esencial para la infección bacteriana (Lin *et al*, 2002).

Los monocitos eliminan microorganismos a través de mecanismos independientes de oxígeno, por ejemplo en la fusión de fagosomas que contienen bacterias y gránulos, que contienen péptidos antimicrobiales (como defensinas o lisosomas) y enzimas hidrolíticas de lisosomas, o a través del secuestro de nutrientes vitales (como el hierro) (Cohen, 1994). *E. chaffeensis* modula el tráfico de vesículas para evitar que lleguen a los lisosomas (Barnewall *et al*, 1997; Webster *et al*, 1998; Mott *et al*, 1999). Esta modulación es esencial, ya que estas bacterias residen exclusivamente en fagocitos con abundantes lisosomas (Rikihisa, 2009).

Las inclusiones de *E. chaffeensis* no se fusionan a los lisosomas, ya que sus compartimentos carecen de glicoproteínas de lisosomas y de actividad de fosfatasa ácida (Barnewall *et al*, 1997). La inhibición de la fusión a lisosomas es específica a

vacuolas parasitóforas, pero ésta es reversible con el tratamiento con oxitetraciclinas (Wells *et al*, 1988).

E. chaffeensis usa diversas estrategias para evadir la fusión de lisosomas. Sus inclusiones replicativas son endosomas tempranos que no llegan a madurar a endosomas tardíos. Estos endosomas acumulan receptores de transferrina (TfRs) y tienen diversos marcadores de endosomas tempranos, como el Rab5 y el antígeno 1 de endosomas tempranos (EEA-1). Parece que esta bacteria usurpa de los lisosomas una vía fisiológica recicladora de TfRs, de esta manera evita la fusión de lisosomas (Rikihisa, 2003).

Una vez que la bacteria establece vacuolas para sobrevivir, necesita encontrar una forma de adquirir nutrientes, para luego poder proliferar en un compartimento. El hierro es un nutriente muy necesario para la supervivencia de esta bacteria. La adquisición de hierro es dependiente de un pool de hierro lábil presente en el citoplasma de las células hospederas. Rikihisa en el año 2002 encontró que este patógeno no puede establecer una infección cuando los monocitos son tratados con un quelante de hierro llamado deferoxima. Una de las características de las inclusiones replicativas de *E. chaffeensis*, es su habilidad para acumular hierro unido a transferrina exógeno (Rikihisa, 2002), por lo tanto, la bacteria puede adquirir hierro directamente de la unión hierro-transferrina presente en las inclusiones.

2.6.1.4 Subregulación de la Generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Los monocitos y macrófagos son mediadores primarios de un sistema de defensa dependiente de oxígeno que genera ROS (superóxido, peróxido de hidrógeno y

radicales de hidroxilo) en exposición a patógenos. Se ha encontrado que el genoma de *E. chaffeensis* no tiene genes codificadores de enzimas detoxificadoras (como SOD o catalasas) ni sistemas reguladores sensitivos de oxígeno de dos componentes (OxyR o SoxRS), lo que significa que esta bacteria ha evolucionado estrategias para prevenir la activación de NADPH oxidasa, la cual cataliza la reducción del oxígeno atmosférico a O_2^- utilizando el NADPH citoplásmico del hospedero, el ROS inicial que puede ser convertido en otros ROS (Rikihis, 2009).

2.6.1.5 Inhibición de la Apoptosis en la Célula Hospedera

La apoptosis es un mecanismo muy importante para eliminar patógenos intracelulares. Una gran variedad de patógenos inducen la apoptosis de las células hospederas, pero se conoce otras, como *E. chaffeensis* que inhiben la apoptosis de células hospederas (DeLeo, 2004).

E. chaffeensis sobrerregula a NF- κ B y a inhibidores de apoptosis de la células hospederas y regula diferencialmente a las ciclinas celulares y la expresión de CDK (Zhang *et al*, 2004)

2.6.1.6 El Sistema de Dos Componentes [Two component system (TCS)]

La transducción del TCS, una familia de sensores de señales, y sistemas de respuestas reguladoras evitan que las bacterias detecten una gran variedad de señales ambientales y hace que respondan rápidamente a los cambios en el ambiente a través de la activación o represión de un gen específico (Dorman *et al*, 2001). Los TCS son importantes en la habilidad de ciertas bacterias patógenas para que puedan montarse y

establecer una infección exitosa en los hospederos. Esto se ha comprobado con los muchos ejemplos vistos en que se atenúa la virulencia de cepas patógenas al eliminar una o más TCS (Groisman, 2001).

2.6.1.7 Activación de Citoquinas

Debido a que no se ha encontrado actividades de endotoxinas o exotoxinas durante la infección de *E. chaffeensis*, las citoquinas pro-inflamatorias del hospedero son consideradas las responsables de los cambios patológicos y de los signos clínicos de la EMH (Rikihisa, 2003). Ya que el LPS no es detectable en esta bacteria, Lee y Rikihisa en 1996, hicieron experimentos para saber cómo y cuáles son los componentes de esta bacteria para inducir la expresión de citoquinas, y encontraron que parece ser que un residuo de carbohidrato del microorganismo es el responsable de la generación de IL-1 β , IL-8, e IL-10 por los monocitos humanos a las 24 horas de establecida la bacteria. Además ellos encontraron que la bacteria no inducía la producción de TNF- α , IL-6, y GM-CSF, lo que significaba que esto podría retardar el desarrollo del sistema inmune protector y por lo tanto ayudaba a que la bacteria se estableciera en macrófagos (Rikihisa *et al*, 2009).

Una vez establecida la bacteria, su plasticidad le ayuda a llegar a todo el cuerpo y causa diversos síntomas. Incluso, puede traspasar la barrera hematoencefálica causando trastornos como la meningoencefalitis. Las linfopenias asociadas a EMH son el resultado de eventos periféricos que pueden incluir un mayor secuestro, consumo o destrucción de células infectadas y no infectadas (Rikihisa *et al*, 2009).

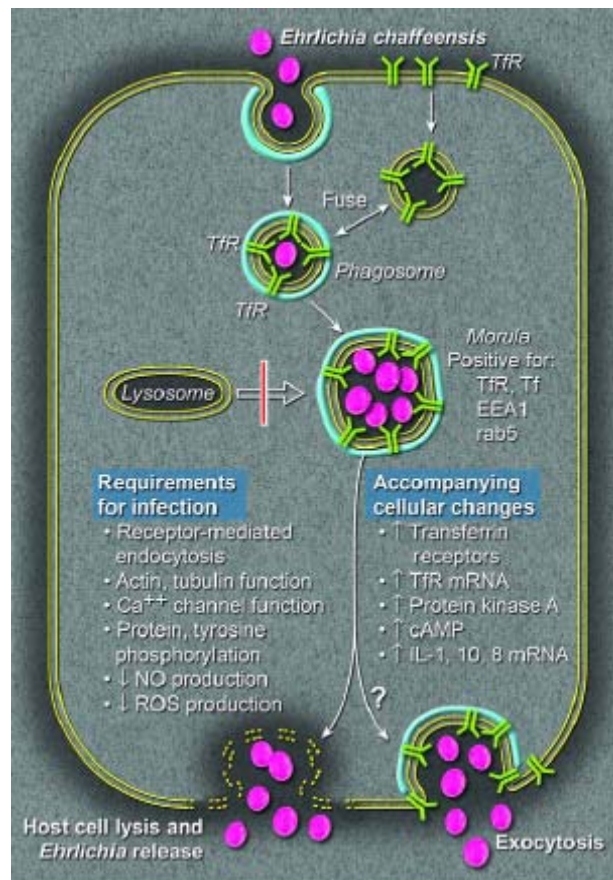


Figura N°4: Entrada mediada por balsas lipídicas, establecimiento y mantenimiento de “nichos” intracelulares de *E. chaffeensis*. La membrana vacuolar se fusiona con los endosomas Tf-TfR. Al mismo tiempo, se inhibe la fusión de lisosomas con las membranas vacuolares. Luego las bacterias pueden salir por exocitosis o por lisis de la célula hospedera para infectar más células. Las líneas turquesas representan a la balsa lipídica. Las líneas cortas verticales blancas representan la subregulación o sobregulación de moléculas o eventos. Esta figura no indica que las proteínas y los eventos estén presentes en la misma célula al mismo tiempo. Tomada de Rikihisa Y. 2009.

2.7 Epidemiología

2.7.1 Ciclo de Vida

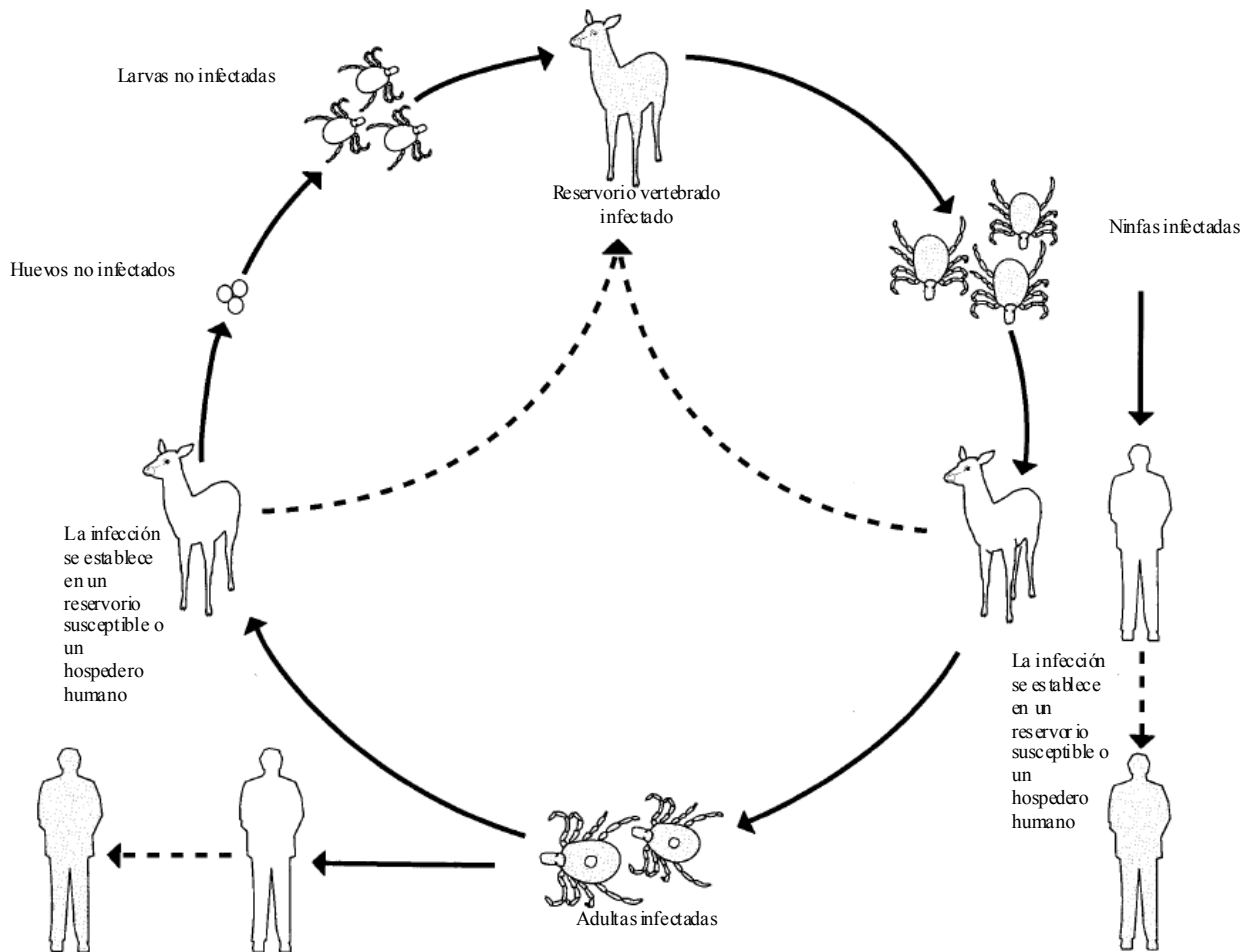


Figura N°5: Ciclo de vida de *E. chaffeensis*.

Las larvas no infectadas al alimentarse de sangre de un reservorio vertebrado infectado (por ejemplo, el venado de cola blanca), adquieren la bacteria y la transmiten a su estadio de ninfa. Las ninfas infectadas pueden transmitir *E. chaffeensis* a reservorios susceptibles o a humanos durante su adquisición de sangre. Las garrapatas adultas adquieren al parásito por transmisión transestadial o al alimentarse de hospederos infectados (Paddock y Childs, 2003a).

2.7.2 Vectores

Ehrlichia spp. son transmitidas por garrapatas duras o de la familia *Ixodidae*. *Amblyomma americanum* o la garrapata de la estrella solitaria es el vector transmisor de EMH en Norte América (Paddock y Childs, 2003a). Ésta se encuentra distribuida predominantemente en los estados del sur de Estados Unidos de América (Paddock y Childs, 2003b).

Se ha aislado a *E. chaffeensis* de otras garrapatas incluyendo a *Rhipicephalus sanguineus* en Camerún (Ndip *et al*, 2009), *Dermacentor variabilis* (Roland *et al*, 1998; Kramer *et al*, 1999) e *Ixodes pacificus* (Kramer *et al*, 1999) en el sur de Estados Unidos de América, *Ixodes ricinus* en Rusia (Alekseev *et al*, 2001), *Amblyomma testudinarium* y *Haemaphysalis yeni* en China (Cao *et al*, 2000) *Amblyomma parvum* en Argentina (Tomassone, 2008) e *Ixodes ovatus* en Japón (Shibata *et al*, 2000).

2.7.3 Hospederos Reservorios

El venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) representa a la única especie vertebrada reconocida como hospedero completo y suficiente para mantener el ciclo de transmisión de *E. chaffeensis* (Paddock y Childs, 2003a), debido a que esta especie es la fuente más importante de sangre para las garrapatas adultas y estadios juveniles de *A. americanum* (Goddard y Varela-Stokes, 2008). Pero se ha aislado a la bacteria de muchas otras especies, incluyendo a cabras domésticas (Dugan *et al*, 2000), caninos domésticos (Breitschwerdt, 1998; Frank y Breitschwerdt, 1999; Zhang *et al*, 2003),

coyotes (Kocan *et al*, 2000), zorros rojos (Davidson *et al*, 1999), mapaches (Comer *et al*, 2000), zarigüeyas (Lockhart *et al*, 1998) y aves migratorias (Alekseev *et al*, 2001).

En el Perú no se ha reportado la detección de ADN de *E. chaffeensis* en ninguna garrapata o reservorio, por lo que el vector y el reservorio son desconocidos.

2.7.3.1 Los Caninos Domésticos Como Hospederos Reservorios

Los perros son potencialmente los reservorios más importantes para todos los patógenos zoonóticos que afectan humanos debido a su gran número en nuestro país y el mundo, a su estilo de vida libre que les da acceso a lugares infestados con garrapatas y a su proximidad con los humanos. Los caninos domésticos pueden servir como vehículo de transporte a las garrapatas para llegar a nuestras casas (Paddock y Childs, 2003a).

Como se indicó anteriormente, Ndip y colaboradores en el 2009 aislaron ADN del agente causante de EMH de la garrapata parda del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) en Camerún y en 1998 Liberato encontró una prevalencia de 11.75% \pm 9.2 de *R. sanguineus* en caninos de los distritos de San Juan de Miraflores, Villa María del Triunfo y Villa el Salvador de la provincia de Lima. Esta garrapata podría ser la probable responsable de la transmisión de la enfermedad, pero no es definitivo hasta que haya un aislamiento y secuenciación de la bacteria en las garrapatas pardas de nuestro país.

2.7.4 Estudios Epidemiológicos

2.7.4.1 Norte América

Ehrlichiosis Monocítica Humana es una enfermedad reportable desde el año 1998 en los Estados Unidos de América. Se presenta predominantemente en los estados del sureste y surcentral de Norte América. En el 2005, se reportó la mayor cantidad de casos (471 casos de EMH), pero estos números subestimaban la verdadera incidencia y prevalencia, ya que los porcentajes de vigilancia activa eran de 330 a 414 casos por cada 100 000 personas (0.03-0.4%) en los estados de Tennessee y Missouri. Los estudios de seroprevalencias indicaron un grado de aproximadamente 12.5% en el estado de Tennessee (Dumler *et al*, 2007).

2.7.4.2 Sudamérica

En Venezuela, evaluaron 182 frotises de sangre periférica de un grupo de individuos que por diferencia de motivos solicitaron la prueba, aquí observaron mórulas intraplaquetarias en 68 personas (37.36%). Este estudio mostró que casi el 38% de los pacientes presentaron mórulas compatibles con las observadas en enfermos con EMH (Tamí, 2003). No se realizaron pruebas serológicas ni moleculares, debido a que cuando realizaron el estudio (en el 2003), no contaban con pruebas de laboratorio rápidas ni accesibles, por lo que el diagnóstico se basó en la visualización de las mórulas y el cuadro clínico.

Recientemente en el año 2008 la revista del CDC publicó los resultados del primer caso de *E. chaffeensis* en un niño en Venezuela confirmado con pruebas moleculares (Martinez *et al*, 2008), éste fue el primer caso en que se encontró ADN de la bacteria en todo Sudamérica.

Por otro lado, en Chile en el año 2003 López y colaboradores realizaron un estudio en 19 dueños de perros enfermos con EMC. Las muestras sanguíneas fueron analizadas con pruebas serológicas (IFI) y con pruebas moleculares (PCR) en búsqueda de dos bacterias (*Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia equi*), se encontró 2 seropositivos (10.5%) pero ninguno resultó positivo a las pruebas moleculares. Debido a que existe en los humanos antigenicidad cruzada entre las diferentes especies de *Ehrlichias*, las pruebas serológicas no precisan con seguridad cuál es la especie presente en los sueros positivos y debido a que las pruebas moleculares salieron negativas no se puede decir confirmatoriamente que existe *E. chaffeensis* en Chile.

En Argentina en el año 1999, Ripoll y colaboradores, reportan los casos de 6 niños con fiebre aguda en la provincia de Jujuy en Argentina. Realizaron pruebas serológicas (IFI) en 16 casas adyacentes a los casos reportados, aquí muestrearon a 105 personas aparentemente sanas y encontraron 15 seropositivos a *E. chaffeensis* (14.2%). Recientemente en el 2008, Tomassone y colaboradores, publican la detección molecular de la bacteria en garrapatas *Amblyomma parvum* en el departamento Moreno. En dicho estudio recolectaron garrapatas de vegetación y de mamíferos, incluyendo humanos y encontraron una frecuencia de 9.2% para la detección de ADN en *A. parvum*.

En el 2004, Calic y colaboradores, en Brasil reportan, 2 casos de EMH diagnosticados con pruebas serológicas (IFI). Más tarde da Costa *et al* en el 2005, hallan una seroprevalencia de 10.5% en la población de Minas Gerais, y en el 2006 reportan nueve nuevos casos. Recientemente, en el 2006 Machado y colaboradores, encuentran ADN de la bacteria en ciervos de pantano brasileros (*Blastocerus dichotomus*) y proponen al ciervo como reservorio natural de la bacteria.

2.7.4.2.1 Perú

Li *et al* en el 2008, encuentran una seroprevalencia de 24.6% para *E. chaffeensis* en la provincia de Lima. Por otro lado, Anaya *et al* en el 2009 evaluaron 130 sueros de pacientes febriles negativos para Rickettsiosis y enfermedad de Carrión procedentes de Ancash y encontraron una seroprevalencia de 9.2%. También en el 2009 Moro *et al* hacen estudios serológicos en diferentes regiones del país incluyendo Piura, Cuzco, Iquitos y Lima. Y encontraron seroprevalencias de 25%, 23%, 3% y 3% respectivamente. Además encontraron una seroprevalencia total de 13% en todo el país.

2.7.4.3 Otras partes del mundo

Se han hallado pacientes seropositivos en Corea (Heo *et al*, 2002; Park *et al*, 2003), Israel (Keysary *et al*, 1999), Italia (Nutti *et al*, 1998; Santino *et al*, 1998), Portugal (Morais *et al*, 1991), Mali (Uhaa *et al*, 1992), Tailandia (Heppner *et al*, 1997) y Burkina Faso (Brouqui *et al*, 1992). Y se ha aislado ADN de la bacteria de garrapatas en China (Cao *et al*, 2000), Japón (Shibata *et al*, 2000) y Camerún (NDip *et al*, 2007). Además encontraron ADN en Japón (Kawahara, 2009) en ciervos de Sika.

2.8 Diagnóstico

El diagnóstico definitivo de HME se basa en la sintomatología clínica y se apoya en hallazgos de laboratorio para su confirmación. En orden de su aplicación rutinaria se encuentran las pruebas serológicas de medición de títulos de anticuerpos específicos, la detección de mórulas en sangre periférica o en leucocitos de líquido cefalorraquídeo, la detección de ADN de la bacteria vía PCR de sangre, o de líquido cefalorraquídeo y el aislamiento de la bacteria.

2.8.1 Diagnóstico clínico

2.8.1.1 Signos Clínicos

Una a dos semanas (9 días en promedio) tras la exposición a garrapatas infectadas, las personas experimentan una fase prodrómica caracterizada por malasia, dolor lumbar o síntomas gastrointestinales, o pueden desarrollar súbitamente fiebre (>39°C). Es muy probable que las personas con EMH busquen atención médica a los 3 a 4 días tras el comienzo de los síntomas, y los signos clínicos frecuentemente incluyen fiebre (en más del 95% de los enfermos), dolor de cabeza (en el 60-75% de los enfermos), mialgias (en el 40-60% de los enfermos), náuseas (40-50% de los enfermos), artralgias (30-35% de los enfermos) y malestar general (en el 30-80% de los enfermos) (Everett *et al*, 1994; Fishbein *et al*, 1994; Paddock y Childs 2003).

Durante el curso de la enfermedad, se desarrollan otras manifestaciones multisistémicas en aproximadamente 10-40% de los afectados con EMH. Estas manifestaciones incluyen tos, faringitis, linfadenopatía, diarreas, vómitos, dolor abdominal, y cambios en el estado mental (Everett *et al*, 1994; Fishbein *et al*, 1994;

Standaert *et al*, 1995; Olano *et al*, 1999). En menor frecuencia se ha reportado conjuntivitis (Simmons y Hughey, 1989; Berry *et al*, 1999), disuria (Fordham *et al*, 1998; Martin *et al*, 1999) y edema periférico (Eng *et al*, 1990). El 30-40% aproximadamente de personas con EMH reporta tener sarpullido o “rash”, pero éste es más común entre adultos infectados con VIH (Paddock *et al*, 2001) y puede ocurrir en los dos tercios de los niños enfermos (Edwards, 1994; Jacobs y Schutze, 1997).

Los patrones hemorrágicos son pleomórficos, éstos incluyen petequias, máculas, máculopapulas y eritema difuso (Barton y Foy, 1989; Simmons y Hughey, 1989; Harkess *et al*, 1990; Fichtenbaun *et al*, 1993; CDC, 1996; Raufman, 1999; Sadikot *et al*, 1999; Berry *et al*, 2000; Nutt y Paddock y Childs, 2003). El prurito generalmente ocurre aproximadamente a los 5 días del comienzo de la sintomatología, es pasajero y puede involucrar las extremidades, tronco, cara y rara vez, palmas y plantas (Edwards *et al*, 1988; Barton *et al*, 1990; Harkess, 1991; Fichtenbaum *et al*, 1993; Fishbein *et al*, 1994; Paddock y Childs, 2003).

2.8.1.2 Anormalidades Hematológicas y Bioquímicas

Se observa una leve a moderada leucopenia en aproximadamente en el 60-70% de los casos durante la primera semana de la enfermedad (Everett *et al*, 1994; Fishbein *et al*, 1994; Jacobs y Schutze, 1997; Standaert *et al*, 2000). Además se observa una linfocitosis relativa o absoluta en la mayoría de personas en recuperación (Everett *et al*, 1994; Caldwell *et al*, 1996). La trombocitopenia es la citopenia más frecuentemente encontrada, y se observa en el 70 a 90% de los enfermos (Fishbein *et al*, 1994; Paddock *et al*, 2001). La mayoría de los infectados con HME presentan hematocrito normal, pero se puede desarrollar anemia en aproximadamente en la mitad de los casos a las 2

semanas del comienzo de la sintomatología (Everett *et al*, 1994; Fishbein *et al*, 1994; Jacobs y Schutze, 1997; Standaert *et al*, 2000).

Un aumento de transaminasas hepáticas leve a moderado se observa en el 80 a 90% de los casos. Es menos común que se eleven la fosfatasa alcalina y los niveles de bilirrubina, los cuales se observan en el 25-60% de los casos (Everett *et al*, 1994; Fishbein *et al*, 1994; Standaert *et al*, 1995; Nutt y Raufman, 1999). También se ha reportado leve a moderada hiponatremia en el 50% de los pacientes humanos y en 70% de los pacientes pediátricos (Everett *et al*, 1994; Jacobs y Schutze, 1997). Muchas otras anomalías bioquímicas pueden ocurrir, éstas reflejan la progresión de la enfermedad hacia un proceso multisistémico. Entre estas anomalías se encuentran aumentos en la tromboplastina parcial activada, en los tiempos de protrombina, en los niveles de productos de degradación de fibrina, en los niveles de creatinina sérica, de lactato deshidrogenasa, de creatinina fosfoquinasa y de amilasa. Además se observan anomalías electrolíticas como hipocalcemia, hipomagnesemia e hipofosfatemia (Manian *et al*, 1989; Dunn *et al*, 1992; Everett *et al*, 1994; Jackson y Jackson, 1997; Paddock *et al*, 2001). Los procesos patofisiológicos responsables por las anomalías electrolíticas no se conocen. En algunos enfermos se ha observado concentraciones disminuidas de albúmina y proteínas séricas, lo cual puede afectar en la medición de los niveles de cationes divalentes (Harkess *et al*, 1990; Abbott. *et al*, 1991; Jackson y Jackson, 1997)

2.8.1.3. Manifestaciones Severas o Inusuales

La Ehrlichiosis Monocítica Humana generalmente se manifiesta como una enfermedad moderada a severa y el 60 a 70% aproximadamente de los enfermos son hospitalizados (Fisbein *et al*, 1994; Carpenter *et al*, 1999; Standaert *et al*, 2000). En algunas personas sin tratamiento, se ha observado un progreso de la enfermedad hacia la muerte en sólo 2 semanas o puede causar fiebre que dura 2 a 3 semanas (Paddock *et al*, 1997; Fordham *et al*, 1998; Martin *et al*, 1999; Dawson *et al*, 2001). En casos donde se haya involucrado múltiples sistemas, se puede desarrollar una grave hipotensión, coagulopatía intravascular diseminada (CID), falla hepática, acidosis metabólica, falla renal, insuficiencia adrenal y disfunción miocárdica (Maeda *et al*, 1987; Fichtenbaum *et al*, 1993; Jackson y Jackson, 1997; Martin *et al*, 1999; Paddock y Childs, 2003). No se conocen los factores responsables de la severidad de la enfermedad y la participación de sistemas de órganos específicos (Paddock y Childs, 2003).

Aproximadamente el 20% de las personas infectadas con *E. chaffeensis* desarrolla signos y síntomas neurológicos (Everett *et al*, 1994; Fishbein *et al*, 1994). Estos signos pueden sugerir un síndrome de meningitis (fotofobia, migrañas, letargia, confusión o parálisis del nervio craneal) o una encefalitis o síndrome de encefalopatía (delirio, adormecimiento, coma, convulsiones, hiperreflexia, clonus o ataxia). Las secuelas de infecciones de SNC por *E. chaffeensis* no han sido bien documentadas, pero se conoce de varios síntomas que persisten por varias semanas como migrañas, fotofobia, parálisis facial o de nervio ocular, temores, pérdida de memoria y confusión (Ratnasamy *et al*, 1996; Davis *et al*, 2000).

Se ha descrito tos y otros síntomas respiratorios en el 20-25% de los casos, sin embargo manifestaciones pulmonares como neumonitis intersticial, efusión pleural, edema pulmonar y el síndrome agudo de distrés respiratorio son componentes frecuentes de una enfermedad severa (Chen *et al*, 1997a; Jackson *et al*, 1997; Fordham *et al*, 1998; Patel y Byrd, 1999; Paddock y Childs, 2003).

Los pacientes pueden desarrollar severas trombocitopenias, coagulopatías y ocasionalmente se desarrollan en manifestaciones hemorrágicas como epistaxis, hemorragia pulmonar, hemorragia gastrointestinal, hematuria y hemorragia conjuntiva (Maeda *et al*, 1987; Abbott *et al*, 1991; Dumler *et al*, 1991; Fichtenbaum *et al*, 1993; Paddock *et al*, 1993; Tal y Shannahan, 1995). La relación caso-fatalidad de EMH se ha estimado en aproximadamente 3% (McQuiston *et al*, 1999; Paddock y Childs, 2003). Las enfermedades fatales se han descrito más frecuentemente en hombres (70%), pacientes mayores (en promedio 51 años de edad, con un rango de 6 a 80 años de edad), y en pacientes debilitados por enfermedades subyacentes o inmunodeficiencias incluyendo enfermos con VIH, asplenia, pacientes con abuso crónico de etanol o terapia con corticosteroides (Paddock y Childs, 2003). La mitad de las muertes ocurren durante la segunda semana de la enfermedad (en un rango de 7 a 68 días) y la muerte se le atribuye a la falla multisistémica de órganos, hemorragias o infecciones bacterianas o fúngicas (Fichtenbaum *et al*, 1993). Se han observado infecciones causadas por citomegalovirus, *Candida* y *Aspergillus* spp. en pacientes severamente enfermos, esto sugiere que la infección con *E. chaffeensis*, puede inducir la supresión del sistema inmune (Walker y Dumler, 1997).

2.8.1.4 Infecciones Asintomáticas

Yevich *et al* en 1995, realizaron estudios en personal militar que entrenaba en un área severamente infestada con garrapatas en Arkansas y encontraron que más de los dos tercios de las personas que demostraron seroconversión a Ehrlichiosis no se encontraban clínicamente enfermos.

2.8.1.5. Diagnóstico Diferencial

La Ehrlichiosis Monocítica Humana es una enfermedad multisistémica con manifestaciones versátiles, y debido a que no posee ninguna característica clínica patognomónica, el diagnóstico diferencial es muy amplio. Los síntomas iniciales pueden ser generales y relativamente vagos; es por esto que los diagnósticos frecuentemente incluyen a una gastroenteritis, infección del tracto respiratorio alto, neumonía o meningoencefalitis, todas éstas causadas por un “síndrome viral” (Everett *et al*, 1994; Paddock y Childs, 2003). También se debe considerar al dengue debido a que es una enfermedad febril endémica en nuestro país.

El dolor abdominal en EMH puede imitar a una colecistitis, por lo que se han realizados colecistotomías en algunos pacientes con EMH antes de haber llegado al diagnóstico correcto (CDC, 1996; Paddock *et al*, 1997). La marcada hipotensión o las anormalidades en los resultados de laboratorio causadas por *E. chaffeensis* pueden ser interpretadas como indicadores de sepsis, púrpura trombocitopénica o neoplasias hematológicas (Fichtenbaum *et al*, 1993; Marty *et al*, 1995; Jackson y Jackson, 1997). La presentación clínica puede ser muy similar a la observada en otras enfermedades

transmitidas por garrapatas, especialmente otras Ehrlichiosis, causadas por *A. phagocitophilum* o *E. ewingii*, y la Fiebre Moteada de las Montañas Rocosas o Rickettsiosis Humana (Walker , 2000).

2.8.2 Diagnóstico Serológico

Existe una gran variedad de pruebas de laboratorio que detectan y miden anticuerpos reactivos de *E. chaffeensis* (Walker *et al*, 2000). Aunque estas pruebas son las más usadas como métodos confirmatorios, existen diversos problemas en su utilización. Las pruebas serológicas pueden dar resultados negativos para la mayoría de personas durante la primera semana de enfermedad. Además existe una reacción cruzada entre especies patogénicas relacionadas a esta bacteria, como por ejemplo, *A. phagocitophilum* y otras especies de *Ehrlichia* spp.; y los niveles de anticuerpos se mantienen altos incluso cuando la persona ya se encuentra sana (Paddock y Childs, 2003a). Esto puede influir en la interpretación y correlación de los resultados con los hallazgos clínicos y epidemiológicos.

2.8.2.1 Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta (IFA)

La mayoría de personas con EMH ha sido diagnosticada con IFA. Actualmente, el estándar de IFA para EMH utiliza la cepa Arkansas de *E. chaffeensis* cultivada en células DH82 (Anderson *et al*, 1991) o células Vero como sustrato (Dawson *et al*, 1993). La colección de sueros pareados durante un intervalo de 3 a 6 semanas es lo indicado para hacer una buena evaluación serológica de EMH (Paddock y Childs, 2003).

Se pueden medir los anticuerpos IgG e IgM por medio de IFA, pero se ha encontrado que la IFA para IgG resulta negativa, hasta en 80% de las personas durante la primera semana de la enfermedad y que los títulos de IgM también dan poca información en este tiempo (Childs *et al*, 1999). Es sustancial obtener muestras de personas que se encuentren en la fase convaleciente de la enfermedad, ya que se ha observado que la mayoría de personas han desarrollado títulos a IFA altos durante la sexta semana post infección (Childs *et al*, 1999; Standaert *et al*, 2000). Desafortunadamente, para propósitos de diagnóstico, las personas con EMH piden ayuda clínica durante los primeros cuatro días de haber comenzado la sintomatología (Fishbein *et al*, 1994), y muchas veces ésta es la única vez que ellos acuden por un diagnóstico (Paddock y Childs, 2003).

2.8.2.2 Western Blot

El uso de Western Blot ha permitido la identificación de una variabilidad antigénica en los aislamientos de *E. chaffeensis* y ha identificado una variabilidad en la reactividad del suero del paciente a diversos antígenos de *E. chaffeensis* (Brouqui *et al*, 1994; Chen *et al*, 1997).

2.8.3 Visualización de Mórulas

Las mórulas se han identificado en frotises de sangre periférica, en preparaciones de capa flogística y en aspirados de médula ósea utilizando tinciones tipo Romanovsky (Wright, Diff-Quik, Giemsa y Leishman) (Paddock y Childs, 2003; Tami *et al*, 2003). Aunque esta técnica ofrece el método diagnóstico más rápido, se considera

que es de baja sensibilidad y rara vez se considera como diagnóstico en la práctica clínica (Paddock *et al*, 1997; Childs *et al*, 1999). Los frotises que muestran las mórulas son detectados en menos del 5% de los leucocitos circulantes. Se describen casos de pacientes con diagnóstico positivo a la enfermedad vía cultivo celular o PCR y se encontró que solamente en un 20 a 30% de estos pacientes se observó las mórulas (Childs *et al*, 1999; Dawson *et al*, 1991a; Paddock *et al*, 1997; Standaert *et al*, 2000).

2.8.4 Amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los ensayos de PCR identifican ADN de *E. chaffeensis* en sangre entera, líquido cefalorraquídeo y suero. Se pueden obtener resultados positivos en muestras de sangre entera durante la fase aguda de la enfermedad, cuando todavía las pruebas serológicas dan negativas (Childs *et al*, 1999).

Este procedimiento solo implica métodos bioquímicos “*in vitro*”. La PCR utiliza la enzima ADN polimerasa que dirige la síntesis de ADN a partir de sustratos desoxinucleótidos y actúa sobre una plantilla de ADN monocatenario. La ADN polimerasa sintetiza ADN en dirección 5’ a 3’ y puede agregar nucleótidos en el extremo 3’ de un oligonucleótido diseñado a medida. Por ende, si un oligonucleótido sintético se une con una plantilla monocatenaria que contiene una región complementaria con el oligonucleótido, la ADN polimerasa podrá usar éste último como cebador y alargarlo en dirección 5’ a 3’ para crear una región extendida de ADN bicatenario (Watson *et al*, 2008).

Se generan dos oligonucleótidos monocatenarios sintéticos (primers), uno complementario con la secuencia del extremo 5' de una cadena del ADN que se va a amplificar (forward) y el otro complementario con el extremo 5' de la otra cadena (reverse). Entonces, el ADN que se va a amplificar se desnaturaliza (es decir, se separa la doble hélice del ADN) y los oligonucleótidos se unen con sus secuencias complementarias (a esta etapa se le conoce como hibridación). En este momento se agregan a la reacción los sustratos ADN polimerasa y desoxinucleótidos, y la enzima extiende los dos cebadores (a esta etapa se conoce como extensión). Esta reacción produce ADN bicatenario sobre la región de interés de ambas cadenas de ADN. Por lo tanto, en este primer ciclo de la PCR se obtienen dos copias bicatenarias de fragmento original de ADN.

Luego, el ADN se somete a otro ciclo de desnaturalización y síntesis con los mismos cebadores para obtener cuatro copias del fragmento evaluado. De esta manera, la realización de ciclos nuevos de desnaturalización y síntesis de ADN dirigida por el cebador amplifica la región entre los dos cebadores en forma geométrica (2, 4, 8, 16, 32, 64, etc.). De esta manera, un fragmento de ADN que primero estaba presente en cantidades muy escasas se amplifica hasta obtener una cantidad relativamente grande.

2.8.4.1 PCR Anidada

Técnica muy sensible de PCR en la que el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada. Este tipo de PCR es muy específica (Watson *et al*, 2008). Por ejemplo para este trabajo, primero se utilizaron primers llamados “outers”, los cuales son las plantillas para amplificar el ADN y detectar si la

bacteria es del género *Ehrlichia spp.* Luego este ADN amplificado sirvió de base para realizar la siguiente PCR, en la cual utilizaron primers llamados “inners” los cuales sirvieron de plantillas para amplificar ADN y detectar si esta *Ehrlichia spp.* pertenece a la especie *Ehrlichia chaffeensis*.

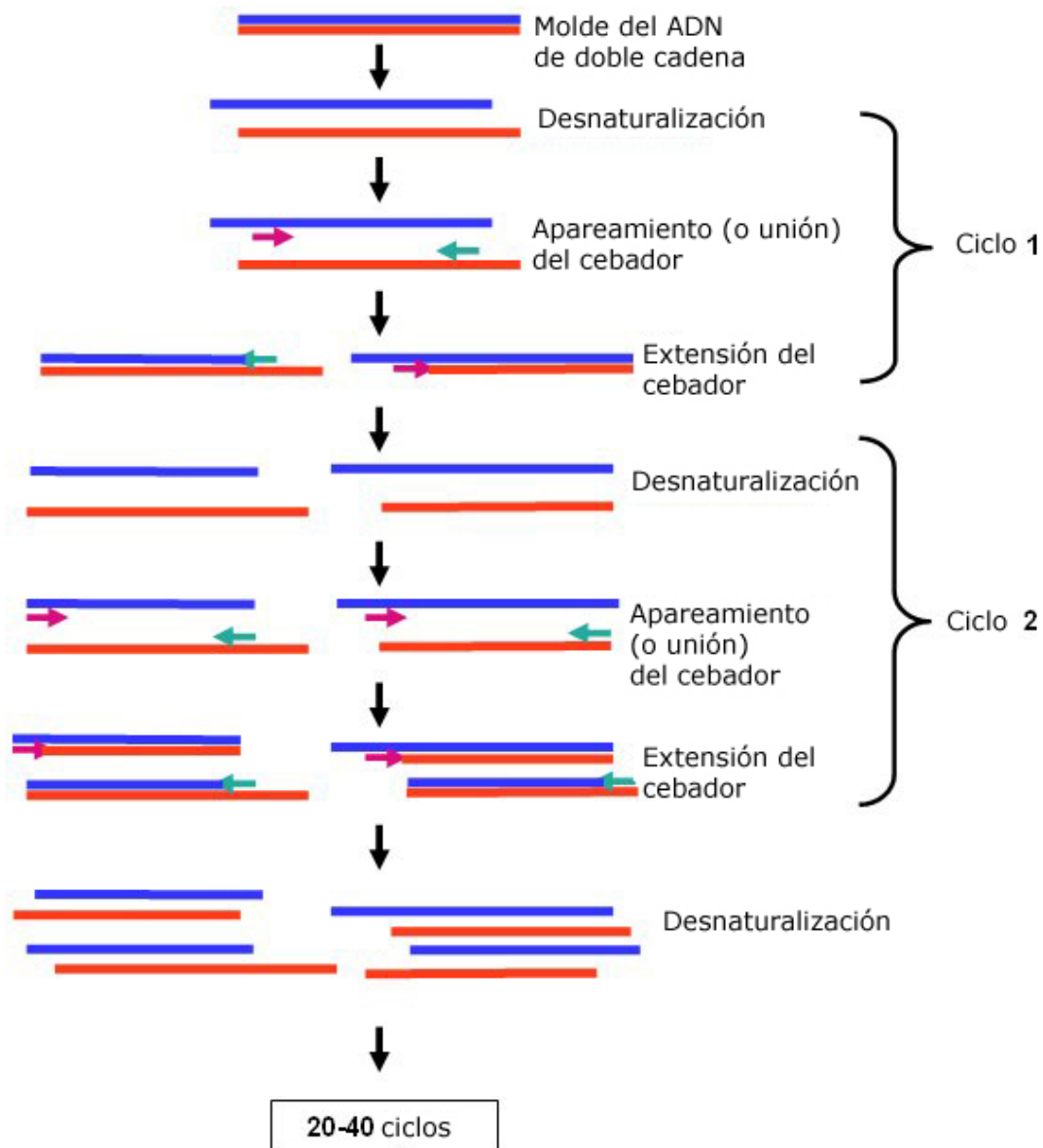


Figura N° 6: Metodología de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

2.8.4.2 Electroforesis en Gel de Agarosa

El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas moléculas importantes biológicamente (aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos) poseen grupos ionizables y existen en solución como especies cargadas, bien como cationes, o bien como aniones. Estas especies cargadas se van a separar en función de su carga cuando se aplica un voltaje a través de los electrodos (Watson *et al*, 2008).

La electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa. Estos geles se colocan en la cubeta de electroforesis, sumergidos en un tampón de pH alrededor de 8. De esta forma, las moléculas de DNA o RNA sometidas a electroforesis se desplazarán al polo positivo ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño, van a emigrar de forma distinta en un gel de electroforesis. La distancia recorrida por cada fragmento de DNA va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de DNA problema (Watson *et al*, 2008).

En el caso de los geles de agarosa, se le añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz

ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de DNA aplicado y los marcadores de peso molecular (Watson *et al*, 2008).

2.8.5 Aislamiento

El aislamiento de especies de *Erhlichia* de sangre, líquido cefalorraquídeo y de otros tejidos requiere de un laboratorio capaz de procesar especímenes clínicos usando técnicas de cultivos celulares. Es decir, un laboratorio clínico equipado con líneas de cultivos celulares que puedan cultivar a *E. chaffeensis* (Paddock y Childs, 2003).

III.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar y Época de Ejecución del Estudio

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Patología Clínica y el Laboratorio de Microbiología – Unidad de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, durante el período de Febrero a Octubre de 2009 en el Departamento de Lima.

3.2 Materiales

3.2.1 Propietarios

Se tomaron todas las muestras sanguíneas que se presentaron al estudio en el periodo de Febrero a Octubre de 2009, el total fue de 60 personas, éstas poseían caninos con Ehrlichiosis, diagnosticados por diferentes métodos (Técnica Indirecta de ELISA, sintomatología clínica, examen hematológico) en las diferentes entidades veterinarias donde se les recluyó pertenecientes a la provincia de Lima. De ellas se extrajo sangre para la detección molecular de la bacteria. Todas las personas que entraron en el estudio firmaron previamente un consentimiento informado (Anexo).

3.2.2 Materiales para Almacenamiento y Toma de la Muestra:

- Tubos de ensayo con anticoagulante (EDTA).
- Agujas 21 x 1 ½ .
- Viales autoclavables.
- Guantes de látex.
- Micropipeta.
- Tips para micropipeta autoclavables de 0.5 µl, 10 µl y 100 µl.
- Centrifuga.
- Congeladora.

3.2.3 Materiales para la PCR Anidada

- Kit de extracción de ADN (QIAGEN).
- Master Mix para PCR (Invitrogen: Platinum® Taq ADN Polimerasa).
- Termociclador (MJ Research Modelo PTC-200) con lector de fluorescencia (MJ Research Modelo Chromo 4).
- Tips para micropipeta.
- Micropipetas.
- Agua destilada.
- Primers específicos (ECC, ECB, HE3, HE1).
- Viales autoclavables.
- Congelador.

3.2.4 Materiales para la Electroforesis en Gel de Agarosa

- Cámara electroforética horizontal.
- Fuentes de poder.
- Transiluminador UV.
- Gel de Agarosa 1,5%.
- Soluciones Buffer (TBE).
- Bromuro de Etidio.
- Marcador de peso molecular para electroforesis (100 – 1000pb).
- Tips para micropipeta autoclavables.
- Micropipetas.
- Agua destilada.
- Cámara fotográfica.
- Parafilm

3.3 Métodos

3.3.1 Toma de Muestra

Los responsables de la toma de muestra fueron el médico cirujano Jorge Kohatzu que labora en la Clínica “La Medalla Milagrosa” en y la MSci Q.F. Olga Li Elías, encargada del Laboratorio de Patología Clínica de la FMV-UNMSM. Se extrajeron aproximadamente 5 ml de sangre entera y se almacenó en tubos de ensayo con anticoagulante (EDTA).

3.3.2 Separación de Leucocitos (capa flogística)

Las muestras de sangre con anticoagulante EDTA, fueron colocadas en viales de 1.5 ml. y sometidas a centrifugación de 13000 x g (4°C) por 5 minutos. A continuación, se separó la capa flogística (rica en leucocitos) de los viales centrifugados, utilizando una micropipeta de 100 ul. y el material separado fue almacenado, rotulado y conservado a -20°C, hasta el momento de la realización de las pruebas moleculares (PCR anidada).

3.3.3 Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN genómico de las 60 muestras de la capa flogística conservadas a -20°C. El procedimiento utilizado para la extracción de ADN (muestras y controles) fue basado en el Kit comercial QIAMP Tissue Kit de QIAGEN.

3.3.4 PCR Anidada (Nested PCR)

Se usaron los siguientes primers diseñados para amplificar segmentos del gen ARNr 16S de *E. chaffeensis* (Carvalho *et al*, 2008):

Outers (Género *Ehrlichia* spp.)

Forward ECC: 5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3'

Reverse ECB: 5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3'

Inners (Especie específicos para *E. chaffeensis*)

Forward HE-1: 5'- CAATTGCTTATAACCTTTTGGTTATAAAT-3'

Reverse HE-3: 5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3'

La primera mezcla de PCR introducida en el termociclador constaba de:

1. Platimun® Taq ADN Polimerasa(*): 2U.
2. Primers
 - a. Forward ECC: 5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3': 0.2 μ M.
 - b. Reverse ECB: 5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3': 0.2 μ M.
3. Templado de la extracción de ADN: 6 μ l.

Esta mezcla se introdujo en el termociclador y aquí tuvo 3 minutos de desnaturalización a 94°C, luego 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, luego 2 minutos de hibridación a 68°C y por último 2 minutos de extensión a 72°C.

Estos productos de PCR fueron analizados utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con tinción de bromuro de etidio. Para considerarse positivos al género *Ehrlichia* spp. debían pesar 478bp.

La segunda mezcla de PCR introducida en el termociclador constaba de:

1. Platimun® Taq ADN Polimerasa(*):2U.
2. Primers
 - a. Forward HE-1: 5'- CAATTGCTTATAACCTTTTGGTTATAAAT-3':
0.2 μ M.
 - b. Reverse HE-3: 5'- TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3':0.2
 μ M.
3. Templado de ADN amplificado en la primer PCR: 6 μ l.

Esta mezcla se introdujo en el termociclador y aquí tuvo 3 minutos de desnaturalización a 94°C, luego 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, luego 2 minutos de hibridación a 58°C y por último un minuto y medio de extensión a 72°C.

Estos productos de PCR también fueron analizados utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con tinción de bromuro de etidio. Para considerarse positivos a especie debían pesar 389bp y estar alineados con el control positivo de *E. chaffeensis*.

(*) El Master Mix para PCR Platimun® Taq ADN Polimerasa de Invitrogen tiene los siguientes componentes: Taq ADN polimerasa, buffer de PCR (Mg⁻), MgCl₂ y mezcla de dinucleótidos.

3.3.5 Electroforesis en Gel de Agarosa

Se virtió en un matraz el tampón de electroforesis TBE (Tris Borato) y el gel de agarosa al 1.5%. Esta solución se fundió en el microondas para homogenizarse. Se dejó enfriar hasta que llegue a los 50°C aproximadamente, se le añadió el bromuro de etidio y se mezcló uniformemente para luego verter la solución en la cámara electroforética horizontal. Se formaron los pocillos utilizando la peineta. En el primer pocillo se situó al marcador de peso molecular conocido. En los siguientes pocillos se situó al control positivo, para esto se utilizó ADN de *E. chaffeensis* extraído de una placa para IFI (Fuller Laboratories) con células infectadas con la bacteria. A la placa se le aplicó un

tratamiento previo con tripsina, para una mejor extracción de ADN. A los siguientes pocillos se les aplicó los productos de PCR (Figura N°7).

Luego se programó la fuente a 100 voltios y se esperó dos horas y media para que lo aplicado en los pocillos migre hacia el polo positivo. Se desarmó la cámara electroforética para liberar el gel, éste fue llevado al transiluminador UV para observar las bandas y por último se fotografió.

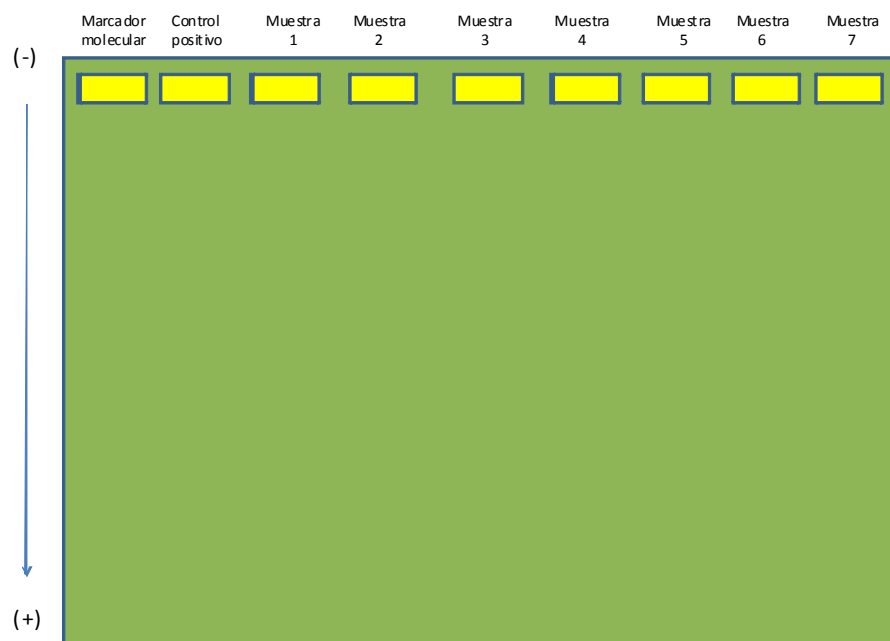
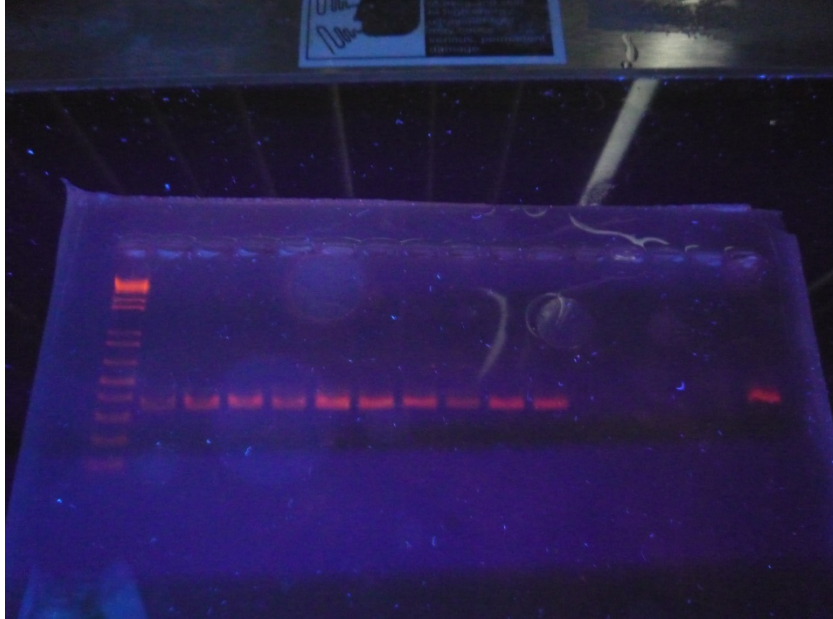


Figura N°7: Aplicación de los productos de la PCR en los pocillos del gel de la cámara electroforética.



Fotografía N°1: Resultados de PCR en gel de Agarosa 1.5%.

3.4 Análisis de los Datos

Los resultados de las pruebas moleculares fueron analizados mediante la estadística descriptiva utilizando frecuencias relativas.

IV.RESULTADOS

- Del total de 60 muestras analizadas en el presente estudio mediante PCR, se determinaron diez muestras positivas para ADN de *E.chaffeensis*, representando una frecuencia relativa de 16.66% a *E. chaffeensis* (Cuadro N°2).
- Las muestras correspondieron a 20 distritos de la provincia de Lima, detectándose dos positivos en los distritos de Lurín (3.33%), dos en San Juan de Lurigancho (3.33%), uno en Comas (1.67%), uno en Chorrillos (1.67%), tres en Carabaylo (5%) y uno en Ate (1.67%) (Anexo).
- De las 60 muestras analizadas 39 (65%) correspondieron a personas del sexo femenino y 21 (35%) del sexo masculino (Anexo).
- De las 39 muestras sanguíneas pertenecientes al sexo femenino ocho (20.5%) fueron positivas. Por otro lado, de las 21 muestras sanguíneas pertenecientes al sexo masculino dos (9.5%) fueron positivas.
- De las diez personas con resultado positivo a la PCR, ocho (80%) fueron del sexo femenino y sólo dos (20%) del sexo masculino (Anexo).
- Los individuos que resultaron positivos a la PCR mantienen ciertas relaciones que deben ser destacadas:

- El paciente N°1 y N°2 son familiares directos y viven en el mismo domicilio.
- El paciente N°14 y N°15 son vecinos.
- El paciente N° 37 y N°38 son familiares directos y viven en el mismo domicilio.

Cuadro N°2: Resultados a las pruebas moleculares (PCR).

	Positivo a <i>E. chaffeensis</i>	Negativo a <i>E. chaffeensis</i>	Total
PCR anidado	10 (16.66%)	50 (83.34%)	60 100%)

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró una frecuencia relativa de 16.66% para la detección de ADN de *E. chaffeensis* en propietarios de caninos con Ehrlichiosis. Este es el primer reporte a nivel nacional de la presencia de ADN de esta bacteria en muestras de sangre periférica de seres humanos. Esta bacteria es el agente causante de la Ehrlichiosis Monocítica Humana (EMH) en el mundo, por lo que este estudio confirma la presencia de *E. chaffeensis* (agente zoonótico) en sangre periférica de seres humanos de nuestro país.

Aunque Moro *et al*, así como Anaya *et al*, reportaron seroprevalencias del agente de la EMH en diversos lugares en el Perú en el 2009, estos estudios sólo demostraron la exposición a bacterias del género *Ehrlichia spp.*, puesto que Paddock y Childs en el 2003 mencionan la existencia de una reacción cruzada entre especies del género *Ehrlichia spp.* Lo que significa que si realizamos pruebas serológicas en una muestra sanguínea para *E. chaffeensis*, los resultados positivos no expresarían a la especie involucrada. Por el contrario, las pruebas moleculares detectan ADN de la bacteria *E. chaffeensis*, por lo que los resultados positivos evidencian la presencia del agente de la Ehrlichiosis Humana en Perú.

Cabe resaltar que la sintomatología de la EMH es inespecífica, lo que quiere decir que se asemeja a muchas enfermedades. Debido a que la enfermedad (en la actualidad) no es bien conocida por médicos humanos de nuestro país y a que su

diagnóstico es oneroso y trabajoso, esta enfermedad podría ser confundida por otras y el tratamiento erróneo de la enfermedad podría traer peores consecuencias. Por otro lado, Yevich *et al*, en el año 1995 mencionan la existencia de infecciones por *E. chaffeensis* asintomáticas, éstas no podrían traer problemas a sus portadores pero podrían transmitir la enfermedad a otras personas a través de transfusiones sanguíneas o podrían servir como reservorios.

Además, se encontró que del total de personas evaluadas, el 65% de éstas eran del sexo femenino, mientras que el 35% eran del sexo masculino. Sumado a esto, el 80% de los positivos a las pruebas moleculares era del sexo femenino y el 20% era del sexo masculino. Probablemente esta relación se debe a que en el estudio se consideraron más mujeres que hombres, así como también, la mayoría de mujeres muestreadas eran amas de casa, las cuales tienden a pasar más tiempo con las mascotas y por el contrario, los hombres no permanecen tanto tiempo dentro del hogar. Además, las mujeres fueron más receptivas a proporcionar una muestra de sangre al estudio, mientras que la mayoría de los varones se negaron a la toma de muestra por parte de los responsables.

No se conocen los reservorios ni vectores que están involucrados en el ciclo de la infección de *E. chaffeensis* en el Perú, pero se cree que los caninos domésticos pueden servir como reservorio en el Perú, debido a que Paddock y Childs en el 2003, describen a los caninos domésticos como los reservorios más importantes para todos los patógenos zoonóticos debido a su gran número, a su estilo de vida libre que les da acceso a lugares infestados con garrapatas, y a su proximidad con los humanos, sumado a esto diversos autores (Breitschwerdt, 1998; Frank y Breitschwerdt, 1999; Zhang *et al*, 2003) han aislado a *E. chaffeensis* de perros. Además se sospecha que *Rhipicephalus*

sanguineus podría ser el vector, debido a que NDip y colaboradores, en el 2009 aisló ADN de *E. chaffeensis* de *R. sanguineus* (garrapata parda del perro) en Camerún, y a que la única garrapata identificada en caninos domésticos del Perú (hasta el momento), es la garrapata parda del perro.

Se realizaron muestreos en personas en 20 distritos de la provincia de Lima y se encontraron dos (3.33%) muestras positivas en el distrito de Lurín, dos (3.33%) en el distrito de San Juan de Lurigancho, una (1.67%) en el distrito de Comas, una (1.67%) en el distrito de Chorrillos, tres (5%) en el distrito de Carabayllo y una (1.67%) en el distrito de Ate, por lo que se concluye que *E. chaffeensis* se encuentra distribuida en pobladores de al menos seis distritos de la provincia de Lima. Además, se encontró que algunos de los individuos que resultaron positivos en las diversas zonas de la provincia de Lima mantienen relaciones geográficas y familiares. Por ejemplo, el paciente N°1 y el paciente N°2 son familiares directos y habitan en el mismo domicilio. Éstas nos indican que existen zonas en más de un distrito de la provincia de Lima que mantienen un ciclo de infección entre garrapatas y seres humanos, en el que muy probablemente estén involucrados los caninos domésticos en la transmisión de la enfermedad.

VI. CONCLUSIONES

- Se encontró una frecuencia relativa de 16.66% a la presencia de ADN de *E. chaffeensis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa anidada en propietarios de caninos con Ehrlichiosis, por lo que se confirma la presencia de esta bacteria en el Perú.
- Estos hallazgos representan el primer reporte de ADN de *E. chaffeensis* (agente zoonótico causal de la Ehrlichiosis Monocítica Humana) en muestras de sangre periférica en humanos en el Perú.
- *Ehrlichia chaffeensis* se encuentra distribuida en pobladores de al menos seis distritos de la provincia de Lima.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar un secuenciamiento del ADN de *E. chaffeensis* obtenido en las muestras sanguíneas.
- Los caninos domésticos podrían jugar un rol importante en la epidemiología de la enfermedad. Se recomienda más estudios en los que se aísle ADN de *E. chaffeensis* de caninos.
- Realizar estudios más extensivos para hallar el vector responsable de la transmisión y el hospedero de la EMH en nuestro país para así poder iniciar un programa de vigilancia epidemiológica.
- Efectuar otros estudios en que se detecte la frecuencia de la exposición a *E. chaffeensis* utilizando pruebas serológicas (IFA) para poder hacer una comparación entre pruebas moleculares y serológicas en el Perú.
- Son pocos los médicos humanos que conocen la enfermedad, por lo que se recomienda que se informe la presencia de *E. chaffeensis* en nuestro país para

que la Ehrlichiosis Monocítica Humana sea considerada como diagnóstico diferencial en diversas enfermedades en humanos.

VIII. LITERATURA CITADA

1. **Abarca K, López J, Perret C, Guerrero J, Godoy P, Veloz A, Valiente-Cheverría F, León U, Gutjahr C, Azócar T. 2007.** *Anaplasma platys* in Dogs, Chile. *Emerging Infectious Disease*. 13:1392-1395.
2. **Abbott KC, Vukelja SJ, Smith CE, McAllister CK, Konkol KA, O'Rourke TJ, Holland CJ, Ristic M. 1991.** Hemophagocytic síndrome: a cause of pancytopenia in human ehrlichiosis. *Am. J. Hematol*. 38:230-234.
3. **Adrianzén G, Chávez A, Casas E, Li O. 2003.** Seroprevalencia de la *Dirofilaria immitis* y Ehrlichiosis canina en tres distritos de Lima. *Rev. Inv. Vet. Perú* 2003; 14 (1):43-48.
4. **Aguiar DM, Hagiwara MK, Labruna MB. 2008.** In vitro isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from Sao Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 489-493.
5. **Alekseev AN, Dubinina HV, Semenov AV, Bolshakov CV. 2001.** Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds. *J. Med. Entomol*. 38:471-474
6. **Anaya E, Morón C, Jaramillo K, Mendoza L, Román R. 2009.** Evidencia de Ehrlichiosis Humana en Ancash, Perú. *Rev. Med Exp. Salud Publica* 26(1):54-57
7. **Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. 1991.** *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol*. 29:2838-2842.
8. **Anderson RG. 1998.** The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem*. 67:199-225.
9. **Barnewall RE, Rikihisa Y. 1994.** Abrogation of gamma interferon-induced inhibition of *Ehrlichia chaffeensis* infection in human monocytes with iron-transferrin. *Infect. Immun*. 2:4804-4810.
10. **Barnewall RE, Rikihisa Y, Lee EH. 1997.** *Ehrlichia chaffeensis* inclusions and early endosomes which selectively accumulate transferrin receptor. *Infect. Immun*. 65:1455-1461.
11. **Barnewall RE, Ohashi N, Rikihisa Y. 1999.** *Ehrlichia chaffeensis* and *E. sennetsu*, but not the human granulocytic ehrlichiosis agent, colocalize with

- transferrin receptor and up-regulate transferrin receptor mRNA by activating iron-responsive protein 1. *Infect. Immun.* 67:2258-2265.
12. **Barros Macieira D, Messick JB, Mello Figueiredo Cerqueira A, Alexandre Freire IM, Coelho Linhares GF, Oliveira Almeida NK, Pereira Almonsy NR. 2005.** Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Clinical Pathology.* 34:44-48.
 13. **Barton LL, Foy TM. 1989.** *Ehrlichia canis* infection in a child. *Pediatrics.* 4:580-584.
 14. **Berry DS, Miller RS, Hooke JA, Massung RF Bennett J, Ottolini MG. 1999.** Ehrlichial meningitis with cerebrospinal fluid morulae. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 18:552-555.
 15. **Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. 1998.** Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella visonii*. *J Clin Microbiol;* 36:2645-51.
 16. **Bremer WG, Schaefer JJ, Wagner ER, Ewing SA, Rikihisa Y, Needham GR, Jittapalapong S, Moore DL, Stich RW. 2005.** Transstadial and intrastadial experimental transmission transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology.* 131:95-105.
 17. **Bouque P, Birg ML, Raoult D. 1994.** Cytopathic effect, plaque formation, and lysis of *Ehrlichia chaffeensis* grown on continuous cell lines. *Infect. Immun.* 62:405–411.
 18. **Brouqui P, Lecam C, Olson J, Raoult D. 1994.** Serologic diagnosis of human monocytic ehrlichiosis by immunoblot analysis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1:645–649.
 19. **Brouqui P, Dumler JS. 2000.** Serologic evidence of human monocytic and granulocytic ehrlichiosis in Israel. *Emerg. Infect. Dis.* 6:314–315.
 20. **Buller RS, Arens M, Hmiel SP, Paddock CD, Sumner JW, Rikihisa Y, Unver A, Gaudreault-Keener M, Manian FA, Liddell AM, Schmulewitz N, Storch GA. 1999.** *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. *N Engl J Med.* 1999 Jul 15;341(3):148-55
 21. **Caldwell CW, Everett ED, McDonald G, Yesus YW, Roland WE, Huang HM. 1996.** Apoptosis of gamma/delta T cells in human ehrlichiosis. *Am. J.Clin. Pathol.* 105:640-646.
 22. **Calic SB, Galvao AM, Bacellar F, Rocha CMBM, Mafra CL, Leite RC, Walker DH. 2004.** Human Ehrlichioses in Brazil: First Suspect Cases. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 8(3):259-262.

23. **Cao WC, Gao YM, Zhang PH, Zhang XT, Dai QH, Dumler JS, Fang LQ, Yang H. 2000.** Identification of *Ehrlichia chaffeensis* by nested PCR in ticks from southern China. *J. Clin. Microbiol.* 38:2778–2780.
24. **Carpenter CF, Gandhi TK, Kong IK, Corey GR, Chen SM, Walker DH, Dumler JS, Breitschwerdt E, Hegarty B, Sexton DJ. 1999.** The incidence of ehrlichial and rickettsial infection in patients with unexplained fever and recent history of tick bite in central North Carolina. *J. Infect. Dis.* 180:900-903.
25. **Carvahlo FS, Wenceslau AA, Carlos RSA, Albuquerque GR. 2008.** Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. *Genet.Mol.Res.* 7(3): 657-662.
26. **Centers for Disease Control and Prevention. 1996.** Human ehrlichiosis – Maryland, 1994. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 45:798-802.
27. **Chavera A, Viera F, Samamé H. 1982.** Ehrlichiosis canina en el Perú. *Anales del VII Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias, Ica - Perú.*
28. **Chen SM, Dumler J, Bakken, JS, Walker DH. 1994.** Identification of a Granulocytotropic *Ehrlichia* Species as the Etiologic Agent of Human Disease. *Journal Of Clinical Microbiology*, p. 589-595
29. **Chen SM, Popov VL, Feng HM, Wen J, Walker D.H. 1995.** Cultivation of *Ehrlichia chaffeensis* in mouse embryo, Vero, BGM, and L929 cells and study of *Ehrlichia*-induced cytopathic effect and plaque formation. *Infect. Immun.* 63:647–655.
30. **Chen SM, Yu XJ, Popov VL, Westerman EL, Hamilton FG, Walker DH. 1997a.** Genetic and antigenic diversity of *Ehrlichia chaffeensis*: comparative analysis of a novel human strain from Oklahoma and previously isolated strains. *J. Infect. Dis.* 175:856–863.
31. **Chen SM, Cullman LC, Walker DH. 1997b.** Western immunoblotting analysis of the antibody responses of patients with human monocytotropic ehrlichiosis to different strains of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4:731–735.
32. **Childs JE, Sumner JW, Nicholson WL, Massung RF, Standaert SM, Paddock CD. 1999.** Outcome of diagnostic tests using samples from patients with culture-proven human monocytic ehrlichiosis: implications for surveillance. *J. Clin. Microbiol.* 37:2997–3000.
33. **Comer JA, Nicholson WL, Paddock CD, Sumner JW, Childs JE. 2000.** Detection of antibodies reactive with *Ehrlichia chaffeensis* in the raccoon. *J. Wildl. Dis.* 36:705–712.
34. **Costa PSG, Carvalho Valle LM, Brigatte ME, Greco DB. 2006.** More About Monocytotropic Ehrlichiosis in Brazil: Serological Evidence of Nine New Cases. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 10:7-10.

35. **Davidson WR, Lockhart JM, Stallknecht DE, Howerth EW. 1999.** Susceptibility of red and gray foxes to infection by *Ehrlichia chaffeensis*. J. Wildl. Dis. 35:696–702.
36. **Davis IE, Paddock CD, Childs JE. 2000.** Ehrlichiosis and the nervous system. En Davis I.E. y Kennedy P.G.E. (cd.), Infectious diseases of the nervous system. Butterworth-Heinemann, Oxford, United Kingdom.
37. **Dawson JE, Fishbein DB, Eng TR, Redus MA, Green NR. 1990.** Diagnosis of human ehrlichiosis with the indirect fluorescent antibody test: kinetics and specificity. J. Infect. Dis. 162:91-95.
38. **Dawson JE, Anderson BE, Fishbein DB, Sanchez JL, Goldsmith CS, Wilson KH, Duntley CW. 1991a.** Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. 29:2741–2745.
39. **Dawson JE, Boggie KL, Warner CK, Cookson K, Jenkins S, Levine JF, Olson JG. 1991b.** Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human Ehrlichiosis in dogs from southeast Virginia. Am J Vet Res 1996; 57: 1175-9.
40. **Dawson JE, Candal FJ, George VG, Ades EW. 1993.** Human endothelial cells as an alternative to DH82 cells for isolation of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, and *Rickettsia rickettsii*. Pathobiology 61:293–296.
41. **Dawson JE, Paddock CD, Warner CK, Greer PW, Bartlett JH, Ewing SA, Munderloh UG, Zaki SR. 2001.** Tissue diagnosis of *Ehrlichia chaffeensis* in patients with fatal ehrlichiosis, by using immunohistochemistry, in situ hybridization, and polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 65:603-609.
42. **DeLeo FR, Allen LA, Apicella M, Nauseef WM. 1999.** NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. J. Immunol. 163:6732-6740.
43. **DeLeo FR. 2004.** Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. Apoptosis. 9: 399-413.
44. **Dorman CJ, McKenna S, Beloin C. 2001.** Regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*, a facultative intracellular pathogen. Int. J. Med. Microbiol. 291:89-96.
45. **Dugan VG, Little SE, Stallknecht DE, Beall AD. 2000.** Natural infection of domestic goats with *Ehrlichia chaffeensis*. J. Clin. Microbiol. 38:448–449.
46. **Dumler JS, Brouqui SP, Aronson J, Taylor JP, Walker DH. 1991.** Identification of *Ehrlichia* in human tissue. N. Eng. J. Med. 325:1109-1110.

47. **Dumler JS, Bakken JS. 1995.** Ehrlichial diseases of humans: emerging tick-borne infections. *Clin. Infect. Dis.* 20:1102-1110.
48. **Dumler JS, Bakken JS. 1998.** Human Ehrlichioses: newly recognized infections transmitted by ticks.
49. **Dumler JS, Chen SM, Asanovich K, Trigiani E, Popov VL, Walker DH. 1995.** Isolation and characterization of a new strain of *Ehrlichia chaffeensis* from a patient with nearly fatal monocytic ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 33:1704–1711.
50. **Dumler JS, Trigiani ER, Bakken JS, Aguero-Rosenfeld ME, Wormser GP. 2000.** Serum cytokine responses during acute human granulocytic Ehrlichiosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, p:6-8
51. **Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. 2001.** Reorganization of Genera in the Families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales; Unificating of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia*, and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*; Description of six New Species Combinations; and Designation of *Ehrlichia equi* and “HGE agent” as Subjective Synonyms of *Ehrlichia phagocytophilum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:2145-2165.
52. **Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken J. 2007.** Ehrlichiosis in humans: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis and treatment. *Clinical Infectious Diseases.* 45: 545-51.
53. **Dunn BE, Monson TP, Dumler JS, Morris CC, Westbrook AB, Duncan JL, Dawson JE, Sims KG, Anderson BE. 1992.** Identification of *Ehrlichia chaffeensis* morulae in cerebrospinal fluid mononuclear cells. *J. Clin. Microbiol.* 30:2207–2210.
54. **Edwards M S. 1994.** Ehrlichiosis in children. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 5:143–147.
55. **Eng TR, Fishbein DB, Dawson JE, Greene CR, Redus M. 1990.** Surveillance of human Ehrlichiosis in the United States: 1988. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 590:306–307.
56. **Everett ED, Evans KA, Henry RB, McDonald G. 1994.** Human Ehrlichiosis in adults after tick exposure: diagnosis using polymerase chain reaction. *Ann. Intern. Med.* 120:730–735.
57. **Fichtenbaum CJ, Peterson LR, Weil GJ. 1993.** Ehrlichiosis presenting as a life-threatening illness with features of the toxic shock syndrome. *Am. J. Med.* 95:351–357.

58. **Fishbein DB, Dawson JE, Robinson LE. 1994.** Human Ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990. *Ann. Intern. Med.* 120:736–743.
59. **Fordham LA, Chung CJ, Specter BB, Merten DF, Ingram DL. 1998.** Ehrlichiosis: findings on chest radiographs in three pediatric patients. *Am. J. Roentgenol.* 171:1421–1424.
60. **Frank JR, Breitschwerdt EB. 1999.** A retrospective study of Ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. *J. Vet. Intern. Med.* 13:194–201.
61. **Goddard J, Varela-Stokes AS. 2008.** Role of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.), in human and animal diseases. *Veterinary Parasitology.* 160:1-12.
62. **Greene, RT. 1997.** Ehrlichiosis canina: Implicaciones clínicas de factores humorales, p. 317-320. En Kirk (ed.), *Terapéutica Veterinaria de Pequeños animales.* 12va ed. McGraw-Hill Interamericana. México.
63. **Groisman EA. 2001.** The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J. Bacteriol.* 183:1835-1842.
64. **Harkess JR. 1991.** Ehrlichiosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 5:37–51.
65. **Harkess JR, Stucky D, Ewing SA. 1990.** Neurologic abnormalities in a patient with human Ehrlichiosis. *South. Med. J.* 83:1341–1343.
66. **Harrus S, Waner T, Bark H, Jongejan F, Cornelissen WCA. 1999.** Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 71:2516-252.
67. **Heimer R, Tisdale D, Dawson JE. 1998.** A single tissue culture system for the propagation of the agents of the human ehrlichioses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58:812–815.
68. **Heo EJ, Park JH, Koo JR, Park MS, Park MY, Dumler JS, Chae JS. 2002.** Serologic and Molecular Detection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophila* (Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent) in Korean patients. *Journal of Clinical Microbiology.* (1): 3082-3085.
69. **Heppner DG, Wongsrichanalai C, Walsh DS, McDaniel P, Eamsila C, Hanson B, Paxton H. 1997.** Human Ehrlichiosis in Thailand. *Lancet* 350:785–786.
70. **Jackson RT, Jackson JW. 1997.** Ehrlichiosis with systemic sepsis syndrome. *Tenn. Med.* 90:185–186.
71. **Jacobs RF, Schutze GE. 1997.** Ehrlichiosis in children. *J. Pediatr.* 131:184–192.

72. **Johnson EM, Ewing SA, Barker RW, Fox JC, Crow DW, Kocan K. 1998.** Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. 74:277-288.
73. **Kawahara M, Tajima T, Torii H, Yabutani M, Ishii J, Harasawa M, Isogai E, Rikihisa Y. 2009.** *Ehrlichia chaffeensis* Infection of Sika Deer, Japan. *EID Journal*. 15(12). ISSN: 1080-6059.
74. **Keysary A, Amram L, Keren G, Stoegeger Z, Potasman I, Jacob A, Strenger C, Dawson JE, Waner T. 1999.** Emerging Infectious Diseases.5(6):775-778.
75. **Kocan AA, Levesque GC, Whitworth LC, Murphy GL, Ewing SA, Barker RW. 2000.** Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. *Emerg. Infect. Dis.* 6:477-480.
76. **Kramer VL, Randolph MP, Hui LT, Irwin WE, Gutierrez AG, Vugia D. J. 1999.** Detection of the agents of human ehrlichioses in ixodid ticks from California. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60:62-65.
77. **LaFont F, van der Goot FG. 2005.** Bacterial infection via lipid rafts. *Cell. Microbiol.* 7:613-620.
78. **Lee E, Rikihisa Y. 1996.** Absence of TNF- α , il-6, and GM-CSF but presence of IL-1 β , IL-8, and IL-10 expression in human monocytes exposed to viable or killed *Ehrlichia chaffeensis*. *Infect. Immun.* 69:4211-4219.
79. **Li O, Díaz del Olmo J, Fernandez V, Hoyos L, Moro M. 2005.** Primer Reporte de Ehrlichiosis Granulocítica Canina. I Congreso CANFELEX.
80. **Li O.** Comunicación personal. Febrero 2008.
81. **Liberato W. 1998.** Prevalencia de ectoparásitos en *canis familiaris* en los distritos de San Juan de Miraflores, Villa María del Triunfo y Villa el Salvador. Tesis de pre grado.
82. **Lin M, Zhu MX, Rikihisa Y. 2002.** Rapid activation of proteine tyrosine kinase and phospholipase C-gamma 2 and increase in cytosolic free calcium are required by *Ehrlichia chaffeensis* for internalization and growth in THP-1 cells. *Infect. Immun.* 70:889-898.
83. **Little T, Hultmark D, Read AF. 2005.** Invertebrate Immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nat. Immunol.* 6:651-654.
84. **Lockhart JM, Davidson WR, Stallknecht DE, Dawson JE, Howerth EW. 1997.** Isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) confirms their role as natural reservoir hosts. *J. Clin. Microbiol.* 35:1681-1686.

85. **Lockhart, JM, Davidson WR, Stallknecht DE, Dawson JE. 1998.** Lack of seroreactivity to *Ehrlichia chaffeensis* among rodent populations. *J. Wildl. Dis.* 34:392–396.
86. **López J, Rivera M, Concha JC, Gatica S, Loeffholz M, Barriga O. 2003.** Ehrlichiosis humana en Chile, evidencia serológica. *Rev. méd. Chile.* 131:1.
87. **Machado RZ, Duarte JM, Dagnone AS, Szabó MPJ. 2006.** Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). *Veterinary Parasitology.* 139:262-266.
88. **Maeda K, Markowitz N, Hawley RC, Ristic M, Cox D, McDade JE. 1987.** Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *N. Engl. J. Med.* 316:853–856.
89. **Martin GS, Christman BW, Standaert SM. 1999.** Rapidly fatal infection with *Ehrlichia chaffeensis*. *N. Engl. J. Med.* 341:763–764
90. **Martinez MC, Gutiérrez CN, Monger F, Ruiz J, Watts A, Mijares VM, Rojas MG, Triana-Alonso FJ. 2008.** Ehrlichia chaffeensis in child, Venezuela. *Emerg Infect Dis.* 2008. 14(3):519-20.
91. **Marty AM, Dumler JS, Imes G, Brusman HP, Smrkovski LL, Frisman DM. 1995.** Ehrlichiosis mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura. Case report and pathological correlation. *Hum. Pathol.* 26:920–925.
92. **McKechnie DB, Slater KS, Childs JE, Massung RF, Paddock CD. 2000.** Survival of *Ehrlichia chaffeensis* in refrigerated, ADSOL-treated RBCs. *Transfusion* 40:1041–1047.
93. **McQuiston JH, Paddock CD, Holman RC, Childs JE. 1999.** The human ehrlichioses in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5:635–642.
94. **Miura K, Rikihisa Y. 2007.** Virulence potential of *Ehrlichia chaffeensis* strains of distinct genome sequences. *Infect. Immun.* 75:3604-3613.
95. **Morais JD, Dawson JE, Greene C, Filipe AR, Galhardas LC, Bacellar F. 1991.** First European case of Ehrlichiosis. *Lancet.* 338:633-634.
96. **Moro PL, Shah J, Li O, Gilman RH, Harris N, Moro MH. 2009.** Short report: Serologic Evidence of Human Ehrlichiosis in Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 80: 242-244.
97. **Mott J, Barnewall RE, Rikihisa Y. 1999.** Human granulocytic Ehrlichiosis agent and *Ehrlichia chaffeensis* reside in different cytoplasmic compartments in HL-60 cells. *Infect. Immun.* 67:1368-1378.
98. **Ndip LM, Ndip RN, Esemu SN, Walker DH, McBride JW. 2009.** Predominance of *Ehrlichia chaffeensis* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from kennel-confined dogs in Limbe, Cameroon. *Exp. Appl. Acarol.* 50:163–16.

99. **Nuti M, Serafini DA, Bassetti D, Ghionni A, Russino F, Rombola P, Macri G, Lillini E. 1998.** *Ehrlichia* infection in Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 4:663–665.
100. **Nutt AK, y Raufman J. 1999.** Gastrointestinal and hepatic manifestations of human Ehrlichiosis: 8 cases and a review of the literature. *Dig. Dis.* 17:37–43.
101. **Ohashi N, Rikihisa Y, Unver A. 2001.** Analysis of transcriptionally active gene clusters of major outer membrane protein multigene family in *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis*. *Infect. Immun.* 69:2083–2091.
102. **Olano JP, Masters E, Cullman L, Hogrefe W, Yu XJ, Walker DH. 1999.** Human monocytotropic ehrlichiosis (HME): epidemiological, clinical and laboratory diagnosis of a newly emergent infection in the United States, p. 262–268. *In* D. Raoult and P. Brouqui (cd.), *Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millennium*. Elsevier, Paris, France.
103. **Paddock CD, Suchard DP, Grumbach KL, Hadley WK, Kerschmann RL, Abbey NW, Dawson JE, Anderson BE, Sims KG, Dumler JS. 1993.** Brief report: fatal seronegative ehrlichiosis in a patient with HIV infection. *N. Engl. J. Med.* 329:1164–1167.
104. **Paddock CD, Sumner JW, Shore GM, Bartley DC, Elie RC, McQuade CR, Martin CR, Goldsmith CS, Childs JE. 1997.** Isolation and characterization of *Ehrlichia chaffeensis* strains from patients with fatal ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 35:2496-2502.
105. **Paddock CD, Folk SM, Shore GM, Machado LJ, Huycke MM, Slater LN, Liddell AM, Buller RS, Storch GA, Monson TP, Rimland D, Sumner JW, Singleton J, Bloch KC, Tang YW, Standaert SM, Childs JE. 2001.** Infections with *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in persons coinfecting with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* 33(9):1586-94.
106. **Paddock CD, Childs JE. 2003a.** *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. *Clin. Microb. Rev.* 16(1):37-64.
107. **Paddock CD, Childs JE. 2003b.** "The ascendancy of *Amblyomma americanum* as a vector of pathogens affecting humans in the United States". *Annu. Rev. Entomol.* 48: 307–37.
108. **Park J, Choi K, Grab DJ, Dumler S. 2003.** Divergent interactions of *Ehrlichia chaffeensis* y *Anaplasma phagocitophilum*-Infected Leucocytes with Endotelial Cell Barriers. *Infection and Immunity.* 71:6728-6733.
109. **Patel RG, Byrd MA. 1999.** Near fatal acute respiratory distress syndrome in a patient with human Ehrlichiosis. *South. Med. J.* 92:333–335.
110. **Perez M, Rikihisa Y, Bohai W. 1996.** *Ehrlichia canis*-Like Agent Isolated from a Man in Venezuela: Antigenic and Genetic Characterization. *J. Clin. Microbiol.* 34:2133–2139.

111. **Popov VI, Chen SM, Feng HM, Walker DH. 1995.** Ultrastructural variation of cultured *Ehrlichia chaffeensis*. J. Med. Microbiol. 43:411-421.
112. **Portnoy DA. 2005.** Manipulation of innate immunity by bacterial pathogens. Curr. Opin. Immunol. 17:25-28.
113. **Raad I, Singh V, Quan TJ. 1989.** Cocurrent positive. Serology for ehrlichiosis and Lyme disease. J. Infect. Dis. 160:727-728.
114. **Ratnasamy N, Everett ED, Roland WE, McDonald G, y Caldwell CW. 1996.** Central nervous system manifestations of human Ehrlichiosis. Clin. Infect. Dis. 23:314-319.
115. **Rikihisa Y. 1991.** The tribe Ehrlichiae and ehrlichial diseases. Clin. Microbiol. Rev. 4:286-308.
116. **Rikihisa Y, Zhi N, Wormser GP, Wen B, Horowitz HW, Hechemy KE. 1997.** Ultrastructural and antigenic characterization of a granulocytic ehrlichiosis agent directly isolated and stably cultivated from a patient in New York State. J. Infect. Dis. 175:210-213.
117. **Rikihisa Y, Barnewall RE. 2002.** Abrogation of gamma interferon-induced inhibition of *Ehrlichia chaffeensis* infection in human monocytes with iron-transferrin. Infect. Immun. 62:4804-4810.
118. **Rikihisa Y. 2003.** Mechanism to create a safe haven by members of the family Anaplasmataceae. Ann. N.Y. Acad.Sci. 990:548-555.
119. **Rikihisa Y. 2009.** Molecular events involved in cellular invasion by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum*. Veterinary Parasitology. 167:155-166.
120. **Ripoll CM, Remondegui CE, Ordonez G, Arazamendi R, Fusaro H, Hyman MJ, Paddock CD, Zaki SR, Olson JG, Santos-Buch CA. 1999.** Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. 61:350-354.
121. **Ristic M, Holland C. 1992.** Ehrlichiosis canina. Manual de las enfermedades infecciosas en pequeños animales. 1era Ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. p. 169-186.
122. **Roland WE, Everett ED, Cyr TL, Hasan SZ, Dommaraju CB, McDonald GA. 1998.** *Ehrlichia chaffeensis* in Missouri ticks. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59:641-643.
123. **Rydkina E, Roux V, Raoult D. 1999.** Determination of the genome size of *Ehrlichia* spp., using pulsed field gel electrophoresis. FEMS Microbiol. Lett. 176:73-78.

124. **Sadikot R, Shaver MJ, Reeves WB. 1999.** *Ehrlichia chaffeensis* in a renal transplant recipient. *Am. J. Nephrol.* 19:674–676.
125. **San Miguel CSY. 2006.** Prevalencia de *Ehrlichia canis* en caninos de la provincia de Sullana. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Alas Peruanas. 51 p.
126. **Santino I, Iori A, Sessa R, Sulli C, Favia G, Del Piano M, Horowitz HW, Kilchevsky E, Haber S, Aguero-Rosenfeld M, Kranwinkel R, James EK, Wong SJ, Chu F, Liveris D, Schwartz I. 1998.** *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Ehrlichia chaffeensis* in the National Park of Abruzzo. *FEMSMicrobiol. Lett.* 164:1–6.
127. **Shibata S, Kawahara M, Rikihisa Y, Fujita H, Watanabe Y, Suto S, Ito T. 2000.** New *Ehrlichia* Species Closely Related to *Ehrlichia chaffeensis* Isolated from *Ixodes ovatus* Ticks in Japan. 38(4): 1331-1338.
128. **Simons K, Toomre D. 2000.** Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:31-39.
129. **Standaert SM, Dawson JE, Schaffner W, Childs JE, Biggie KL, Singleton Jr J, Gerhardt RR, Knight ML, Hutcheson RH. 1995.** Ehrlichiosis in a golf-oriented retirement community. *N. Engl. J. Med.* 333:420–425.
130. **Standaert SM, Yu T, Scott MA, Childs JE, Paddock CD, Nicholson WL, Singleton J, Blaser MJ. 2000.** Primary isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from patients with febrile illnesses: clinical and molecular characteristics. *J. Infect. Dis.* 181:1082–1088.
131. **Sumner JW, Nicholson WL, Massung RF. 1997.** PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. *J. Clin. Microbiol.* 35:2087–2092.
132. **Sumner JW, Childs JE, Paddock CD. 1999.** Molecular cloning and characterization of the *Ehrlichia chaffeensis* variable-length PCR target: an antigen-expressing gene that exhibits interstrain variation. *J. Clin. Microbiol.* 37:1447–1453.
133. **Tal A, Shannahan D. 1995.** Ehrlichiosis presenting as a life-threatening illness. *Am. J. Med.* 98:318–319.
134. **Tamí I. 2003.** Ehrlichiosis humana: *Ehrlichia* trombocítica en sangre periférica. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* V.23 n.2. Caracas.
135. **Tamí I, Tamí-Maury IM. 2004.** Identificación morfológica de *Ehrlichia* sp. En las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana en Venezuela. *Rev Panam Salud Pública.* 16(5):345-9.

136. **Tan HP, Dumler JS, Maley WR, Klein AS, Burdick JF, Fred PF, Thuluvath PJ, Markowitz JS. 2001.** Human monocytic Ehrlichiosis: an emerging pathogen in transplantation. *Transplantation* 71:1678–1680.
137. **Tomassone L, Nuñez P, Gürtler RE, Ceballos LA, Orozco MM, Kitron UD, Farber M. 2008.** *Ehrlichia chaffeensis* in *Amblyomma parvum* Ticks, Argentina. *EID Journal*. 14(12). ISSN: 1080-6059
138. **Uhaa IJ, MacLean JD, Green CR, Fishbein DB. 1992.** A case of human ehrlichiosis acquired in Mali: clinical and laboratory findings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46:161–164.
139. **Vinasco J, Li O, Alvarado A, Díaz D, Hoyos L, Tabachi L, Sirigireddy K, Ferguson C, Moro MH. 2007.** Molecular evidence of a new strain of *Ehrlichia canis* from South America. *Journal of Clinical Microbiology*: 2716-2719.
140. **Walker DH, Dumler JS. 1997.** Human monocytic and granulocytic ehrlichioses. Discovery and diagnosis of emerging tick-borne infections and the critical role of the pathologist. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 121:785–791.
141. **Walker DH, and the Task Force on Consensus Approach for Ehrlichiosis (CAFE):** Diagnosing human ehrlichioses: Current status and recommendations. *ASM News* 2000; 66: 287-290.
142. **Watson JD, Baker TA, Steohen PB, Gann A, Levine M, Losick R. 2008.** *Biología molecular del gen. 5ta Edición.* Editorial Médica Panamericana. Madrid – España. P:689-724.
143. **Webster P IJdo JW, Chicoine LM, Fikrig E. 1998.** The agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis resides in an endosoma compartment. *J. Clin. Invest.* 101: 1932-1941.
144. **Wells CL, Jechorek RP, Maddaus MA, Simmons RL. 1988.** Effects of clindamycin and metronidazole on the intestinal colonization and translocation of enterococci in mice. *Antimicro. Agents. Chemother.* 32: 1769-1775.
145. **Yevich SJ, Sanchez JL, DeFraités RF, Rives CC, Dawson JE, Uhaa IJ, Johnson BJ, Fishbein DB. 1995.** Seroepidemiology of infections due to spotted fever group rickettsiae and *Ehrlichia* species in military personnel exposed in areas of the United States where such infections are endemic. *J. Infect. Dis.* 171:1266–1273.
146. **Yu XJ, Crocquet-Valdes P, Walker DH. 1997.** Cloning and sequencing of the gene for a 120-kDa immunodominant protein of *Ehrlichia chaffeensis*. *Gene* 184:149–154.
147. **Yu XJ, McBride JW, Zhang X, Walker DH. 2000.** Characterization of the complete transcriptionally active *Ehrlichia chaffeensis* 28 kDa outer membrane protein multigene family. *Gene* 248:59–68.

148. **Yu XJ, McBride JW, Walker DH. 2006.** Restriction and expansion of *Ehrlichia* strain diversity. *Veterinary Parasitology*. 143:337-346.
149. **Zhang X, Zhang J, Long SW, Ruble RP, Yu XJ. 2003.** Experimental *Ehrlichia chaffeensis* infection in beagles. *Journal of Medical Microbiology*. 52:1021-1026.
150. **Zhang JZ, Sinha M, Luxon BA, Yu XJ. 2004.** Survival strategy of obligately intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: a novel modulation of immune response and host cell cycles. *Infect. Immun.* 72:498-507.

IX. ANEXO

Cuadro N°3

Sexo, Distrito de Procedencia y Resultados de PCR de los individuos participantes del estudio.

Número de muestra	Sexo	Distrito de procedencia	Resultado a la PCR
1	Femenino	Lurín	POSITIVO
2	Femenino	Lurín	POSITIVO
3	Femenino	Santiago de Surco	Negativo
4	Femenino	Santiago de Surco	Negativo
5	Femenino	Santa Anita	Negativo
6	Femenino	Cercado de Lima	Negativo
7	Masculino	Chorrillos	Negativo
8	Femenino	Cercado de Lima	Negativo
9	Masculino	Lurín	Negativo
10	Femenino	San Isidro	Negativo
11	Femenino	Ate	Negativo
12	Femenino	San Juan de Lurigancho	Negativo
13	Femenino	San Juan de Lurigancho	Negativo
14	Femenino	San Juan de Lurigancho	POSITIVO
15	Femenino	San Juan de Lurigancho	POSITIVO
16	Femenino	Comas	POSITIVO
17	Masculino	Comas	Negativo
18	Femenino	Comas	Negativo
19	Masculino	San Juan de Lurigancho	Negativo
20	Masculino	La Molina	Negativo
21	Femenino	La Molina	Negativo
22	Femenino	La Molina	Negativo
23	Femenino	San Bartolo	Negativo
24	Femenino	San Bartolo	Negativo
25	Femenino	San Luis	Negativo
26	Masculino	San Luis	Negativo
27	Femenino	San Luis	Negativo
28	Femenino	La Molina	Negativo

29	Femenino	La Molina	Negativo
30	Femenino	San Juan de Miraflores	Negativo
31	Femenino	Carabayllo	Negativo
32	Femenino	Chorrillos	POSITIVO
33	Femenino	Cercado de Lima	Negativo
34	Femenino	Carabayllo	POSITIVO
35	Femenino	San Martín de Porres	Negativo
36	Femenino	Miraflores	Negativo
37	Femenino	Carabayllo	POSITIVO
38	Masculino	Carabayllo	POSITIVO
39	Masculino	La Victoria	Negativo
40	Masculino	Ate	POSITIVO
41	Masculino	Santiago de Surco	Negativo
42	Femenino	San Juan de Miraflores	Negativo
43	Femenino	Santa Anita	Negativo
44	Masculino	Santa Anita	Negativo
45	Masculino	Santa Anita	Negativo
46	Femenino	Santa Anita	Negativo
47	Femenino	Santa Anita	Negativo
48	Masculino	San Juan de Lurigancho	Negativo
49	Masculino	San Juan de Lurigancho	Negativo
50	Masculino	San Juan de Lurigancho	Negativo
51	Masculino	San Juan de Lurigancho	Negativo
52	Masculino	Comas	Negativo
53	Femenino	Pachacámac	Negativo
54	Femenino	Pachacámac	Negativo
55	Masculino	Pachacámac	Negativo
56	Masculino	Pachacámac	Negativo
57	Masculino	Miraflores	Negativo
58	Femenino	Chaclacayo	Negativo
59	Femenino	Villa El Salvador	Negativo
60	Masculino	Villa El Salvador	Negativo



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
LABORATORIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA



PROTOCOLO DE TOMA Y
PROCESAMIENTO DE MUESTRA

“DETECCIÓN HEMATOLÓGICA, SEROLÓGICA Y MOLECULAR DE *Ehrlichia chaffeensis* Y
Ehrlichia canis EN HUMANOS CON SÍNTOMAS CLÍNICOS COMPATIBLES CON
EHRlichiosis Y EXPOSICIÓN A GARRAPATAS”

Toma de Muestra:

- Se colectarán muestras de sangre periférica:
 - 8 ml de sangre venosa de la vena cefálica, utilizando tubos vacutainer para la extracción de suero para la detección serológica.
 - 8 ml de sangre venosa de la vena cefálica con anticoagulante (EDTA) para la detección hematológica y molecular de *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis*.
- Las muestras serán conservadas en el Laboratorio de Patología Clínica (FMV-UNMSM)

Procesamiento de Muestra:

- Hematología:
 - Las muestras de sangre con anticoagulante (EDTA) serán procesadas en el Laboratorio de Patología Clínica (FMV-UNMSM).
 - Se evaluarán las tres líneas celulares circulantes:
 - Glóbulos Rojos; Glóbulos Blancos y Plaquetas.
 - Hemograma completo y Buffy Coat (Examen de capa flogística).
 - Identificación de corpúsculos de inclusión basófilos intracitoplasmáticos en Glóbulos Blancos.
- Serología
 - A las muestras de sangre sin anticoagulante se colectará el suero en tubos de prueba de 5 ml para la realización de la Inmunofluorescencia Indirecta (IFA) para detectar anticuerpos contra *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis*.
- Biología molecular:
 - Concluidas las pruebas hematológicas, las muestras de sangre con anticoagulante (EDTA), se procesarán para la detección de ADN de *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis* mediante técnicas moleculares.

Lima, _____ de _____ 2009

FIRMA: _____
D.N.I.: _____