



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
POSTGRADO EN MEDICINA VETERINARIA



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN ULTRAESTRUCTURAL Y
MOLECULAR DE *Ehrlichia* sp. EN CÉLULAS
MONONUCLEARES DE PERROS**

LIC. CLARA NANCY GUTIÉRREZ

Maracay, Noviembre de 2002



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
POSTGRADO EN MEDICINA VETERINARIA



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN ULTRAESTRUCTURAL Y
MOLECULAR DE *Ehrlichia* sp. EN CÉLULAS
MONONUCLEARES DE PERROS**

LIC. NANCY GUTIÉRREZ

Trabajo de Grado presentado ante la Ilustre
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
como requisito parcial para optar al título de
MAGISTER SCIENTIARUM en Medicina Veterinaria,
mención **MICROBIOLOGÍA**

Tutores: Prof. Erlinda Sánchez de Porras
Prof. Francisco Triana

Maracay, Noviembre de 2002



UC



F Facultad de
C Ciencias
V Veterinarias

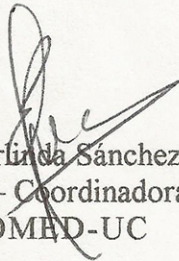
Postgrado en Medicina Veterinaria

VEREDICTO

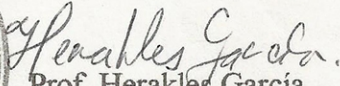
Quienes suscriben, Miembros del Jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, para evaluar el Trabajo de Grado titulado: "**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN ULTRAESTRUCTURAL Y MOLECULAR DE EHRlichia SP EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE PERROS**", presentado por la Estudiante Graduada LIC. CLARA NANCY GUTIÉRREZ, titular de la Cédula de Identidad No. 4.567.564, quien cumple así el requisito parcial para optar al título de **Magíster Scientiarum**, en el Programa de Postgrado en Medicina Veterinaria, Mención Microbiología, dejan constancia de lo siguiente:

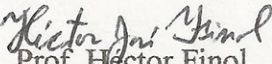
- 1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los Miembros del Jurado, éste fijó el día Viernes primero (01) de noviembre del año dos mil dos a las 2:00 p.m., para que el autor lo defendiera en forma pública, lo que ésta hizo en el Salón de Usos Múltiples del Postgrado, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual el autor respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el Jurado; todo ello conforme a lo dispuesto en los artículos 44, 49, 50, 51 y 52 del Reglamento de Estudios de Postgrado vigente.
- 2.- Finalizada la defensa pública del Trabajo, el Jurado decidió **APROBARLO** por considerar que, sin hacerse solidario de las ideas expuestas por el autor, se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado, debido a que constituye un valioso aporte en el conocimiento en las especies de *Ehrlichia* presentes en caninos de la Región Central del país y su importancia en el contexto de un diagnóstico precoz, altamente sensible y específico.

En fe de lo cual se levanta este Veredicto, en Maracay el primero de noviembre del año dos mil dos.


Prof. Erlinda Sánchez
Tutora – Coordinadora
BIOMED-UC




Prof. Herakles García
Miembro Principal
FCV-UCV


Prof. Héctor Finol
Miembro Principal
FC-UCV

DEDICATORIA

A Dios, por brindarme la bella oportunidad de vivir.....

A mi madre Clara, Johnny, Víctor, Shancy y María...

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos:

- ❖ A la Universidad Central de Venezuela y Universidad de Carabobo instituciones que permitieron la culminación de esta etapa académica.
- ❖ Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad de Carabobo por financiar este trabajo de investigación.
- ❖ Al Prof. Guillermo Comach quién me inició en esta línea de investigación junto con mi compañera María Martínez.
- ❖ A la Prof. Erlinda Sánchez, tutora de este trabajo, quién aportó sus sabios consejos y asesoría en cada una de las etapas del estudio.
- ❖ Al Prof. Francisco Triana, tutor de esta tesis, por brindarme sus conocimientos desde los inicios de mi carrera profesional.
- ❖ A mi compañera, amiga y hermana María Martínez, quién no permitió que me rindiera cuando ya creía que no podía continuar. Por haber disfrutado como disfrutó la realización de los cultivos primarios y por su esfuerzo y logro al obtener el material fotográfico de estos cultivos.
- ❖ A la Dra. Cruz María Arraga de Alvarado quién nos ha orientado con sus conocimientos sobre Ehrlichiosis desde que nos iniciamos en estos estudios.
- ❖ A los Drs. Pedro Avilán, y Luis Silva por haber aceptado conformar el grupo asesor de esta investigación.
- ❖ Al Dr. Antonio Bretaña por brindarme su colaboración con el material fotográfico correspondiente a la microscopía electrónica de transmisión.
- ❖ A la Dra. Jacqueline Dawson del CDC de Atlanta, Estados Unidos, quién gentilmente colaboró con los cultivos DH82 infectados con *E. canis* y *E. chaffeensis*, a partir de los cuales se extrajo el ADN que se utilizó como controles positivos en la prueba de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).
- ❖ Al Dr. Ibulaimu Kakoma de la Universidad de Illinois, Estados Unidos, por su colaboración con las láminas de *E. canis* y suero control positivo, los cuales fueron utilizados en este trabajo.
- ❖ A mis compañeros del postgrado, especialmente a Héctor Zerpa, quién además de ser un excelente compañero de estudio me brindó su amistad sincera.
- ❖ Al Dr. Héctor Castillo, Jefe de la sección de caninos del Dpto. de Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias y a todo el personal que allí labora.

- ❖ Al personal de la Biblioteca de la Universidad Central de Venezuela, por ser como son, siempre dispuestos a ofrecer con amor y buen gusto sus servicios.
- ❖ Al personal del Laboratorio de la cátedra de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, especialmente a los profesores Francisco García, Elena de Moissant y María Elena García por estar siempre dispuestos a colaborar.
- ❖ Al personal de Médicos Veterinarios del Hospital de Pequeños Animales "Dr. Daniel Cabello" de la Facultad de Ciencias Veterinarias, quienes prestaron su valiosa colaboración en la selección de los perros con Ehrlichiosis Canina utilizados en este estudio.
- ❖ Al personal del Laboratorio del Hospital de Pequeños Animales "Dr. Daniel Cabello" de la Facultad de Ciencias Veterinarias, especialmente a la Lic. Rosiris Henríquez, en cuyas instalaciones se realizaron las determinaciones hematológicas de los perros seleccionados con Ehrlichiosis Canina.
- ❖ Al personal del Laboratorio del Centro Clínico Universitario La Morita, especialmente a las Lic. Betty Castellanos y Judith Guillén, en cuyas instalaciones se realizaron las determinaciones hematológicas de los perros inoculados experimentalmente.
- ❖ A la Dra. Marisol De Vera, quién siempre estuvo pendiente de los avances logrados en esta investigación.
- ❖ A los Drs. Miguel Marrero y Maritza Alvarez por su orientación y ayuda prestada.
- ❖ Al Centro de Investigaciones Biomédicas (BIOMED-UC) por facilitarme sus laboratorios y equipos para la realización del estudio.
- ❖ A todo el personal de BIOMED-UC por ser excelentes compañeros y amigos quienes me dieron su apoyo en todo momento.
- ❖ A mis compañeros de trabajo del Departamento de Microbiología y Parasitología, especialmente a Morella de Rolo, Juan Luis León, Ana de Cedeño, Roél Sánchez e Irma Agrela. Sin su apoyo y ayuda no hubiese podido culminar la parte manuscrita del trabajo.
- ❖ A mis alumnos de la Universidad de Carabobo: Gisela, Esther, Alvaro y Mercys, quienes me ofrecieron su calurosa amistad y colaboraron en algunos aspectos importantes del laboratorio.

Finalmente, no se me puede olvidar un agradecimiento a todos los caninos, animales nobles, que participaron en este trabajo, especialmente a los perros inoculados experimentalmente (Loquita y Linda), quienes compartieron un tiempo importante durante el cual se desarrolló esta investigación.

RESUMEN

En Venezuela se han realizado investigaciones que evidencian la presencia de Ehrlichias en perros. El método de uso rutinario para el diagnóstico de la Ehrlichiosis Canina es el Frotis de Capa Blanca (FCB) teñido con coloraciones tipo Romanowski, pero debido a su baja sensibilidad y especificidad no ha permitido la identificación precisa de las diferentes especies que infectan al perro. La Inmunofluorescencia Indirecta es el método serológico más utilizado, útil para estudios epidemiológicos pero en nuestro país ha tenido un uso limitado debido a lo costoso que resulta la adquisición comercial del antígeno. Por otra parte, están ampliamente documentadas las reacciones serológicas cruzadas entre Ehrlichias pertenecientes a un mismo genogrupo, por lo tanto este método tampoco asegura la identificación de la especie Ehrlichial. Por estas razones, se llevó a cabo el presente trabajo con la finalidad de aislar en cultivo *in vitro* Ehrlichia sp. de células mononucleares de perros como también realizar la identificación ultraestructural y molecular mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para el aislamiento se llevaron a cabo dos metodologías. La primera consistió en sembrar directamente en la línea celular continua DH82, células infectadas de nueve perros con signos clínicos de Ehrlichiosis Canina en cuyos FCB se observaron inclusiones basófilas intracitoplasmáticas en células mononucleares. La segunda metodología se realizó a través del establecimiento de cultivos primarios *in vitro* a partir de monocitos obtenidos de un perro infectado experimentalmente. El aislamiento del microorganismo se logró utilizando esta última metodología y esto se evidenció por la aparición de inclusiones basófilas y fluorescentes teñidas con la coloración de Giemsa e Inmunofluorescencia Directa respectivamente. Para

comprobar la infectividad de los cultivos primarios se inoculó un segundo canino. Con muestras sanguíneas extraídas antes de la inoculación, este animal resultó seronegativo al antígeno de *E. canis* y al realizar la PCR con cebadores específicos para *E. canis* y *E. chaffeensis* no hubo amplificación de los productos esperados.

Mediante la observación de las características ultraestructurales de los cuerpos elementales dentro de vacuolas intracitoplasmáticas de células mononucleares, se determinó que las inclusiones basófilas observadas en los FCB de los nueve perros, corresponden a bacterias del grupo Ehrlichia Monocítica Canina.

Utilizando cebadores específicos para las Ehrlichias monocíticas *E. canis* y *E. chaffeensis* se estandarizó la técnica PCR anidada. Luego de aplicada esta técnica a las nueve muestras sanguíneas de perros se identificó la especie *E. canis* en todos los perros y *E. chaffeensis* en cuatro de estos animales. También se determinó la presencia de *E. canis* y *E. chaffeensis* en las muestras del primer perro inoculado experimentalmente, en los cultivos primarios y en las muestras del segundo canino infectado experimentalmente. Estos resultados constituyen el primer reporte en el país y sur América de infección con *E. chaffeensis* en caninos y de coinfección con dos especies monocíticas

SUMMARY

The presence of Ehrlichia in Venezuelan dogs has been previously documented. The routine diagnosis method for canine Ehrlichiosis is the buffy coat smear (BCS) analysis using Romanowsky staining. Due to its inherent low sensibility and specificity, this method does not allow a precise identification of different Ehrlichia species in infected dogs. Indirect Immunofluorescence is widely used and is suitable for epidemiological studies, however, its use is limited in our country due to the high cost of the commercial antigen. In addition, immunological cross-reactions between different species of the same genogroup do not allow specific identification. For these reasons, the aim of this work was to isolate, via *in vitro* culture, *Ehrlichia* sp. from dogs mononuclear cells and to achieve ultrastructural and molecular identification using Transmission Electron Microscopy and PCR.

Two methods were tested for isolation. One which consisted in seeding infected cells from nine dogs with clinical signs of Canine Ehrlichiosis and BCS showing cytoplasmic basophile inclusions in mononuclear cells, directly on to growing DH82 cells. The second method consisted in the establishment of primary cultures *in vitro* using monocytes from an experimentally infected dog. The evidence of basophile and fluorescent inclusions via Giemsa staining and direct immunofluorescence, respectively, showed that the second approach was successful. In order to test the infectivity of the primary cultures, a second healthy canine was inoculated. Before inoculation, the animal was seronegative (using *E. canis* antigen) and PCR-negative using specific primers for *E. canis* and *E. chaffeensis*.

The ultrastructural characteristics of elementary bodies inside cytoplasmic vacuoles from mononuclear cells, allowed to determine that the basophile inclusions

observed in BCS from the nine dogs, corresponded to bacteria belonging to the group canine monocytic Ehrlichias.

Nested PCR was standardized using specific primers for the monocytic Ehrlichias *E. canis* and *E. chaffeensis*. Analysis of blood samples from the nine dogs showed that *E. canis* was present in all of them and *E. chaffeensis* in four. It was also determined that *E. canis* and *E. chaffeensis* were present in the samples from both experimentally inoculated dogs and in the primary cultures. These results constitute the first report in our country and in Southamerica of canine infection with *E. chaffeensis* and coinfection with two monocytic ehrlichial species.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	vi
SUMMARY	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
1. Ehrlichiosis	6
1.1 Definición y etiología	6
1.2 Clasificación taxonómica	6
1.3 Ciclo evolutivo	9
1.4 Características ultraestructurales	11
1.5 Generalidades históricas	12
2. Ehrlichiosis Canina	13
2.1 Patogenia y Patología	14
2.2 Manifestaciones clínicas	16
2.3 Inmunidad	17
2.4 Transmisión	17
2.5 Tratamiento	18
3. Diagnóstico	18
3.1 Frotis de Capa Blanca (FCB)	19

3.2 Diagnóstico serológico	20
3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	21
3.3.1 Extracción del ADN	22
3.3.2 La prueba de la PCR como herramienta para la identificación de bacterias	24
4. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Ehrlichia</i> sp	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. Aislamiento de Ehrlichia Monocítica Canina a partir de perros infectados natural y experimentalmente:	29
1.1 Establecimiento de la línea celular continua DH82	30
1.2 Aislamiento de Ehrlichia Monocítica Canina directamente en la línea celular continua DH82 cultivada <i>in vitro</i>	32
1.2.1 Extracción sanguínea	33
1.2.2 Frotis de Capa Blanca (FCB)	33
1.2.3 Obtención de células mononucleares por gradiente de Ficoll/Hypaque (F/H)	34
1.2.4 Obtención de leucocitos después de la aplicación de un buffer de lisis	34
1.3 Aislamiento de Ehrlichia Monocítica Canina en cultivos primarios <i>in vitro</i> de monocitos sanguíneos obtenidos de un perro infectado experimentalmente	35
1.3.1 Cultivos primarios de monocitos	36
1.3.1.1 Cultivos primarios de monocitos no infectados	36
1.3.1.2 Cultivos primarios de monocitos infectados	37
1.4 Inoculación experimental de un perro sano utilizando como inóculo cultivos primarios de monocitos infectados	38
2. Detección de Ehrlichia Monocítica Canina en los cultivos <i>in vitro</i> por coloración de Giemsa e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	39

3.	Identificación ultraestructural de <i>Ehrlichia</i> sp a través de Microscopía de Electrónica de Transmisión (MET)	40
4.	Identificación de <i>Ehrlichia canis</i> y <i>Ehrlichia chaffeensis</i> mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	41
4.1	Extracción de ADN a partir de muestras sanguíneas y cultivos	41
4.2	Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada para el diagnóstico de <i>Ehrlichia canis</i> y <i>Ehrlichia chaffeensis</i>	42
4.3	Análisis de secuencia y estimación de condiciones óptimas para la hibridización	45
IV.	RESULTADOS	47
1.	Aislamiento de Ehrlichia Monocítica Canina a partir de perros infectados natural y experimentalmente	47
1.1	Establecimiento de la línea celular continua DH82	47
1.2	Aislamiento de Ehrlichia Monocítica Canina directamente en la línea celular continua DH82 cultivada <i>in vitro</i>	49
1.2.1	Frotis de Capa Blanca (FCB) y Hematología	49
1.2.2	Selección mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) tanto de sueros negativos como de sueros con un alto título de Acs necesarios para preparar el conjugado para la IFD	51
1.3	Aislamiento de <i>Ehrlichia</i> Monocítica Canina en cultivos primarios <i>in vitro</i> de monocitos sanguíneos obtenidos de un perro infectado experimentalmente	53
1.3.1	Características clínicas, hematológicas y FCB del perro inoculado experimentalmente	54
1.3.2	Cultivos Primarios de monocitos <i>in vitro</i>	58
1.4	Características clínicas, hematológicas y FCB del perro inoculado con los cultivos primarios de monocitos infectados	62
2.	Identificación ultraestructural de <i>Ehrlichia</i> sp. a través de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	66

3. Identificación de <i>Ehrlichia canis</i> y <i>Ehrlichia chaffeensis</i> mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	67
3.1 Extracción de ADN a partir de muestras sanguíneas	67
3.2 Análisis de secuencias a través del programa Gene Runner	67
3.3 Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada para el diagnóstico de <i>E. canis</i> y <i>E. chaffeensis</i>	68
3.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada de las muestras sanguíneas de los perros infectados naturalmente	72
3.5 PCR anidada del perro inoculado experimentalmente y de los cultivos primarios obtenidos de este perro	80
3.6 PCR del perro inoculado con los cultivos primarios de monocitos infectados	85
V. DISCUSIÓN	88
VI. CONCLUSIONES	106
VII. RECOMENDACIONES	107
VIII. BIBLIOGRAFÍA	109
ANEXOS	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°		Página
1	Ciclo evolutivo.	10
2	Monocito con mórula difusa (MD) y dos mórulas compactas (MC). FCB teñido con Giemsa.	20
3	Representación esquemática del operón <i>rrn</i> .	26
4	Curva de crecimiento de la línea celular DH82.	48
5	Frotis de Capa Blanca donde se observan las inclusiones intracitoplasmáticas basófilas correspondientes a las mórulas (M). en células mononucleares.	50
6	Inmunofluorescencia Indirecta.	52
7	Temperatura rectal observada 15 días antes y después de la inoculación experimental.	55
8	Hemoglobina y Hematocrito después de la inoculación experimental.	56
9	Leucocitos y Plaquetas después de la inoculación experimental.	57
10	Velocidad de sedimentación globular después de la inoculación experimental.	57
11	Cultivos Primarios infectados después del noveno día de cultivo <i>in vitro</i> . Coloración Giemsa.	59
12	Cultivos Primarios infectados después del noveno día de cultivo <i>in vitro</i> . Inmunofluorescencia Directa.	60
13	Cultivos Primarios donde se evidencia el incremento en el número de mórulas a diferentes días postinfección.	60
14	Cultivos Primarios. Figura 15 A. Monocitos con múltiples mórulas intracitoplasmáticas. Coloración de Giemsa. Figura 15 B. Inmunofluorescencia Directa.	61

15	Figura 16 A. Monocito en proceso de destrucción celular en donde se observan fragmentos nucleares (FN). Figura 16 B. Mitosis.	61
16	Figura 17 A. Control de monocitos no infectados. Coloración de Giemsa. Figura 17 B. Control de monocitos no infectados. Inmunofluorescencia Directa.	62
17	Temperatura rectal 7 días antes y después de la inoculación.	63
18	Hemoglobina y Hematocrito después de la inoculación experimental.	64
19	Leucocitos y Plaquetas después de la inoculación experimental.	64
20	Velocidad de sedimentación globular después de la inoculación experimental.	65
21	Microscopía Electrónica de Transmisión. Vacuola intracitoplasmática con organismos Ehrlichiales.	66
22	Electroforesis en gel de agarosa de ADN extraído a partir de muestras sanguíneas de perros.	68
23	Representación esquemática del gen ARNr 16S en <i>E. canis</i> , <i>E. chaffeensis</i> y <i>E. coli</i> .	69
24	Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados utilizando los cebadores ECC/ECB variando la temperatura de hibridación.	70
25	Electroforesis en gel de agarosa de los productos formados durante la segunda PCR (cebadores de especie).	71
26	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la primera PCR (ECC/ECB) utilizando 1 µl de ADN extraído de las muestras sanguíneas de perros infectados naturalmente.	73
27	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la primera PCR (cebadores ECC/ECB) utilizando 10 µl de ADN extraído de las muestras sanguíneas de perros infectados naturalmente.	73
28	Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de la segunda PCR (cebadores ECA/HE3) realizada con los productos de la primera PCR (1µl de ADN extraído de las muestras).	75

29	Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de la segunda PCR (cebadores ECA/HE3) realizada con los productos de la primera PCR (10 µl de ADN extraído de muestras sanguíneas).	75
30	Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de la segunda PCR (cebadores HE1/HE3) realizada con los productos de la primera PCR (1 µl de ADN extraído de muestras sanguíneas de perros infectados naturalmente).	77
31	Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de la segunda PCR (cebadores HE1/HE3) realizada con los productos de la primera PCR (10 µl de ADN extraído de muestras sanguíneas de perros infectados naturalmente).	77
32	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la primera (cebadores ECC/ECB) PCR a partir del ADN extraído de la muestra sanguínea del perro utilizado como inóculo.	78
33	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR (cebadores de especie) realizada con los productos de la primera PCR con ADN extraído de la muestra sanguínea utilizada como inóculo.	79
34	Electroforesis de los productos de la primera (cebadores ECC/ECB) PCR realizada con 10 µl de ADN extraído de las muestras sanguíneas del perro inoculado experimentalmente.	81
35	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR (cebadores: ECA/HE3) del perro inoculado experimentalmente.	81
36	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR (cebadores: HE1/HE3) del perro inoculado experimentalmente.	82
37	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la primera (cebadores ECC/ECB) PCR de los cultivos primarios infectados.	83

38	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR con los cultivos primarios (cebadores ECA/HE3).	84
39	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR con los cultivos primarios (cebadores HE1/HE3).	84
40	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la primera PCR (cebadores ECC/ECB) del perro inoculado experimentalmente utilizando como inóculo cultivos primarios.	86
41	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR (cebadores: ECA/HE3) del perro inoculado experimentalmente con los cultivos primarios.	86
42	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR (cebadores: HE1/HE3) del perro inoculado experimentalmente con los cultivos primarios.	87

I. INTRODUCCIÓN

Las Ehrlichias son organismos Rickettsiales con tropismo por una variedad de células y elementos sanguíneos como los linfocitos, monocitos, granulocitos y plaquetas. Estos microorganismos son importantes desde el punto de vista veterinario debido a que producen enfermedades infecciosas, transmitidas por garrapatas en diversas especies animales, tanto de interés comercial como en las de compañía para el hombre (Ristic y Huxsoll, 1984; McDade, 1990; Fishbein y Dawson, 1991; Rikihisa, 1991).

En el perro se han descrito hasta los momentos *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. platys* (*Anaplasma platys*), *E. equi* (*Anaplasma phagocytophila*) y *E. risticii* (*Neorickettsia risticii*), de las cuales *E. canis* es la responsable del cuadro clínico más severo y ha sido la causa de epizootias con pérdidas importantes en perros de la raza Pastor Alemán (Nims *et al.*, 1971; Harvey *et al.*, 1978; Anderson *et al.*, 1992a; Kakoma *et al.*, 1994; Dawson *et al.*, 1996a; Breitschwerdt *et al.*, 1998). También se han reportado enfermedades infecciosas en el humano producidas por *E. chaffeensis*, Ehrlichia Granulocítica Humana (*Anaplasma phagocytophila*) y *E. ewingii* señalándose actualmente como una zoonosis, por lo tanto cada día se incrementan y adquieren más importancia las investigaciones en esta área (Anderson *et al.*, 1992b; Chen *et al.*, 1994; Bakken *et al.*, 1994; Buller *et al.*, 1999).

Entre las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la enfermedad, tanto en animales como en el hombre, se ha reportado el Frotis de Capa Blanca (FCB) teñido con coloraciones tipo Romanowski. Este método es económico y adecuado para la

fase aguda de la enfermedad, cuando hay más probabilidad de conseguir las Ehrlichias en sangre periférica; es de fácil ejecución pero requiere de un personal con mucha experiencia en el reconocimiento morfológico de las Ehrlichias. Además, su utilidad queda limitada para Ehrlichias granulocíticas y plaquetarias, ya que su sensibilidad es muy baja para Ehrlichias monocíticas (Rikihisa, 1991; Campbell, 1994, Harrus *et al.*, 1997).

En Estados Unidos, se está utilizando desde el año 1992, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como método que permite la identificación a nivel de especie. Es un procedimiento de fácil ejecución, útil por su elevada especificidad y sensibilidad, pero por esta última característica la técnica debe ser realizada con extremadas precauciones y controles para evitar resultados falsos positivos por contaminación con ADN exógeno (Anderson *et al.*, 1992b).

Aún con estos avances, los procedimientos de uso rutinario en ese país son los métodos indirectos para la detección de anticuerpos por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), utilizando antígenos (Ags) obtenidos *in vitro* mediante el aislamiento de la bacteria en cultivos celulares, sin embargo en la actualidad hay la limitante de que son muy pocos los laboratorios que ofrecen estos Ags en forma comercial. Todo se ha quedado confinado a los laboratorios de investigación, por lo que se hace difícil implementar esta técnica serológica en los laboratorios destinados al diagnóstico de Ehrlichiosis (Rikihisa, 1991; Munderloh *et al.*, 1996; Goodman *et al.*, 1996). De acuerdo a lo reportado en la literatura, estos cultivos no son fáciles de desarrollar en cualquier laboratorio, por lo que estas bacterias están consideradas entre los microorganismos de difícil cultivo y requieren además de equipos, materiales y reactivos de costo elevado (Dawson *et al.*, 1991a; Dawson *et al.*, 1991b; Dawson *et al.*, 1996b, Keysary *et al.*, 1996).

En Venezuela, los pocos laboratorios que hay para el diagnóstico de la Ehrlichiosis, tanto animal como humana, generalmente utilizan el método directo de FCB, de manera que el diagnóstico de las Ehrlichias se hace en base a sus características morfológicas y a las manifestaciones clínicas de los animales o humanos infectados, obviándose otros métodos como la PCR o IFI. Sin embargo, la Dra. Cruz María Arraga de Alvarado, del Laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, ha reportado estudios realizados con IFI utilizando como Ag *E. platys* (*Anaplasma platys*) obtenidos en ese laboratorio a través de inoculaciones experimentales en perros (Arraga-Alvarado *et al.*, 1997) y Ags de *E. canis* y *E. chaffeensis* gentilmente cedidos por la Dra. Jacqueline Dawson del CDC (Center for Disease Control and Prevention) de Atlanta Georgia, Estados Unidos.

En el laboratorio dirigido por la Dra. Yasuko Rikihisa de la Universidad de Ohio de Estados Unidos, Pérez *et al.* (1996), aislaron un microorganismo en cultivo celular DH82, el cual fue caracterizado antigénica y molecularmente. Este aislado fue obtenido de una persona asintomática del estado Lara, Venezuela. Cuando se realizó la secuenciación parcial del gen 16S del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) del aislado y se comparó con las cepas *E. canis* de Florida y Oklahoma (Estados Unidos), se determinó un 99,9 % de homología con la cepa de Oklahoma; esta Ehrlichia es referida como Ehrlichia Humana Venezolana y es el primer reporte a nivel mundial de *E. canis* en humanos.

En la misma Universidad de Ohio, Unver *et al.* (2001), aislaron *E. canis* en cultivo celular DH82. El organismo procedía de un perro que con 16 animales más eran entrenados para procedimientos militares del estado Lara, Venezuela y quienes habían resultado positivos a *E. canis* en la prueba de PCR. Mediante esta técnica se identificó la misma especie de Ehrlichia en *Rhipicephalus sanguineus*. Luego de analizar la secuencia de nucleótidos del gen ARNr 16S encontradas en las muestras

de los perros y garrapatas y compararlas con las secuencias de varias cepas de *E. canis*, una cepa de *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. platys* y *Neorickettsia helminthoeca*, registradas en el Banco de Genes, se determinó que tanto la Ehrlichia de los perros como la de las garrapatas son idénticas al aislado humano reportado previamente, por lo tanto sugieren que el perro es el reservorio de Ehrlichia Humana Venezolana y *R. sanguineus*, sirve como vector, el cual se alimenta ocasionalmente de humanos.

Por otro lado, en la Universidad de Carolina del Norte, Estados Unidos, en el Laboratorio dirigido por el Dr. Edward Breitschwerdt, Suksawat *et al.* (2001a), comprueban la coinfección con *E. canis*, *E. platys* y *E. equi* (*Anaplasma phagocytophila*) en un perro de Tailandia y otro de Venezuela. Estos tres últimos estudios demuestran la necesidad de iniciar investigaciones en nuestro país que conlleven tanto al aislamiento *in vitro* en cultivos celulares de Ehrlichia monocítica canina, como la estandarización de técnicas en Biología Molecular como la prueba de PCR. El establecimiento del cultivo permitiría disponer de Ags para ser utilizados en la realización de la técnica de IFI para realizar estudios de prevalencia e incidencia tanto en la población canina como en la humana, a fin de conocer mejor la situación epidemiológica de esta infección en nuestro país.

Al estandarizar la PCR, se dispondría de una valiosa herramienta que permitiría caracterizar clínicamente los casos de Ehrlichiosis humana como también caracterizar cepas o especies diferentes a las descritas en la literatura, tanto en animales como en humanos. Con esta técnica, se podría contribuir a dilucidar el (los) reservorio (s) y posibles vectores diferentes a *R. sanguineus*.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- ❖ Aislar e identificar ultraestructural y molecularmente *Ehrlichia* sp. presente en células mononucleares de perros.

Objetivos específicos:

- ❖ Cultivar *in vitro* los microorganismos aislados de animales infectados naturalmente y de un animal infectado experimentalmente.
- ❖ Reproducir la infección por inoculación experimental, en un perro sano, utilizando el microorganismo aislado en cultivo celular.
- ❖ Demostrar de acuerdo a las características morfológicas ultraestructurales que el microorganismo corresponde al género *Ehrlichia*, mediante Microscopía Electrónica de Transmisión.
- ❖ Identificar a través de la prueba de PCR, la especie Ehrlichial presente en los perros infectados natural y experimentalmente.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Ehrlichiosis

1.1 Definición y etiología

La Ehrlichiosis es una enfermedad infecciosa febril aguda y en algunas ocasiones crónica o latente transmitida por garrapatas que afecta una amplia variedad de especies animales como caninos, equinos, bovinos, caprinos, ovinos, felinos, móridos y a los humanos (McDade, 1990; Fishbein y Dawson, 1991; Rikihisa, 1991; Bouloy *et at.*, 1994; Wen *et at.*, 1995).

El agente etiológico es una bacteria gramnegativa que se colorea de azul intenso o púrpura con coloraciones tipo Romanowski, es intracelular obligatoria, inmóvil, generalmente redondeada u ovalada, pero a veces es pleomórfica, especialmente cuando se multiplica en cultivos celulares *in vitro*. Dependiendo de la especie de Ehrlichia, infecta principalmente células de origen mieloide por lo que puede ser visualizada en monocitos, linfocitos, granulocitos y plaquetas circulantes. Una de sus principales características es que a nivel ultraestructural se observan como organismos individuales incluidos dentro de vacuolas limitadas por membranas (Ristic y Huxsoll, 1984; Rikihisa, 1991; Campbell, 1994).

1.2 Clasificación taxonómica

Las Ehrlichias pertenecen al orden *Rickettsiales*, el cual está constituido por tres familias: *Rickettsiaceae*, *Anaplasmataceae* y *Bartonellaceae*. Hasta el año 2000, las bacterias del género *Ehrlichia* pertenecían a la familia *Rickettsiaceae*, esta familia a su vez

comprendía tres tribus: *Rickettsia*, *Ehrlichia* y *Wolbachia*. Anderson *et al.* (1991) proponen una distribución de las especies del género *Ehrlichia* en tres genogrupos (tabla 1), la cual resultó de la comparación de las secuencias de nucleótidos del gen ARNr 16S.

Dumler *et al.* (2001) realizan un estudio analizando las secuencias de nucleótidos de los genes ARNr 16S y el operón *groESL* de bacterias pertenecientes a los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Cowdria*, *Neorickettsia* y *Wolbachia* registradas antes del año 2000 en el Banco de Genes. Para el análisis también utilizaron la secuencia de nucleótidos del gen ARNr 16S de *Escherichia coli*, especies del género *Rickettsia*, *Clamidia trachomatis* y otras bacterias asociadas a artrópodos. Como resultado del estudio, los investigadores proponen: (i) cambiar los géneros de las tribus *Ehrlichia* y *Wolbachia* a la familia *Anaplasmataceae* y eliminar la estructura de tribu de la familia *Rickettsiaceae*. De esta forma la familia *Anaplasmataceae* está constituida por bacterias intracelulares obligatorias que se multiplican dentro de vacuolas intracitoplasmáticas de la célula hospedadora mientras que los miembros de la familia *Rickettsiaceae* son bacterias intracelulares obligatorias que crecen libres en el citoplasma o núcleo de la célula hospedadora; (ii) ampliar el género *Anaplasma* e incluir a *Ehrlichia phagocytophila*, *E. bovis* y *E. platys*. Sugieren que *Anaplasma phagocytophila* com. nov. comprenda como sinónimos a *E. equi* y el agente de la Ehrlichiosis Granulocítica Humana; (iii) añadir al género *Ehrlichia* a *Cowdria ruminantium* como *Ehrlichia ruminantium* com. nov junto con las especies *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii* y *E. muris*; (iv) ampliar el género *Neorickettsia* para incluir las especies *E. risticii* y *E. senetsu*, por lo tanto la familia *Anaplasmataceae* quedaría conformada por cuatro grupos genéticos:

Grupo *E. phagocytophila*/*Anaplasma*:

- *E. phagocytophila*
- *E. equi*
- *Ehrlichia* sp. agente de la Ehrlichiosis Granulocítica Humana
- *E. platys*
- *E. bovis*

Tabla 1. Clasificación de las Ehrlichias

	Hospedador vertebrado	Transmisión	Principales Células Blanco
Genogrupo I			
<i>E. canis</i>	Caninos	Picadura de garrapatas <i>R. sanguineus</i>	Monocitos, linfocitos, Macrófagos
<i>E. chaffeensis</i>	Humanos, perros	venados, Picadura de garrapatas <i>Amblyomma americanum</i>	Monocitos, linfocitos Macrófagos
<i>E. ewingii</i>	Caninos	Picadura de garrapatas <i>A. americanum</i>	Polimorfonucleares
<i>E. muris</i>	Ratón salvaje	Desconocida	Monocitos Macrófagos
<i>Cowdria ruminantium</i>	Ganado ovejás, antílope, africano	bovino, venados, búfalo Picadura de garrapatas <i>Amblyomma</i> sp.	Endotelio
Genogrupo II			
<i>E. equi</i>	Caballos, perros	<i>Ixodes</i> sp. Picadura de garrapatas	Neutrófilos
<i>E. phagocytophila</i>	Ganado ovejás, venados	bovino, <i>Ixodes ricinus</i> . Picadura de garrapatas	Neutrófilos
Ehrlichia Granulocítica Humana	Humanos, Roedores	venados <i>I. scapularis</i> (dammini) Picadura de garrapatas	Neutrófilos
<i>E. platys</i>	Caninos	Desconocida	Plaquetas
<i>Anaplasma marginale</i>	Ganado bovino	<i>Boophilus</i> , <i>R. sanguineus</i> , otras pica-duras de garrapatas	Eritrocitos
Genogrupo III			
<i>E. sennetsu</i>	Humanos	Posible consumo de pescado crudo	Monocitos Macrófagos
<i>E. risticii</i>	Caballos	Desconocida	Monocitos, enterocitos, células cebadas o mastocitos
<i>Neorickettsia helmintoeca</i>	Caninos	Ingestión de tremátode de pez	Macrófagos
<i>N. elokomonica</i>	Caninos	Ingestión de tremátode de pez	Macrófagos
<i>Stellantchamus falcatus</i> Agente (SF)	No se conoce	Tremátode de pez Gris	Desconocido

Fuente: Dawson *et al.*, 1996a; Walker y Dumler y 1996; Dumler y Bakken, 1998; Ogden *et al.*, 1998.

Grupo *E. phagocytophila*/Anaplasma:

- *A. marginale*
- *A. centrale*
- *A. ovis*

Grupo *E. canis*/Cowdria:

- *E. canis*
- *E. chaffeensis*
- *E. ewingii*
- *E. muris*
- *C. ruminantium*

Grupo *E. sennetsu*/Neorickettsia:

- *E. sennetsu*
- *E. risticii*
- *Ehrlichia* sp. agente SF
- *N. helminthoeca*

Especies *Wolbachia*:

- *W. pipientis*

1.3 Ciclo evolutivo

Nyindo *et al.* (1971), estudiaron las diferentes formas evolutivas de *Ehrlichia canis* en cultivos primarios de monocitos de perros *in vitro* demostrando que se presentan tres estadios diferentes: cuerpos elementales, cuerpos iniciales y mórulas. Los cuerpos elementales miden alrededor de 0,5 μm de diámetro por lo que son difíciles de observar con el microscopio de luz, aunque se pueden visualizar por Inmunofluorescencia Directa o Microscopía Electrónica de Transmisión. McDade (1990) propone el siguiente ciclo evolutivo: los cuerpos elementales entran a los monocitos por un proceso de adherencia semejante al observado en la fagocitosis, se multiplican por fisión binaria dentro del

fagosoma inhibiendo la fusión fagolisosomal por un mecanismo desconocido (Ristic *et al.*, 1972; McDade, 1990).

Después de 3 a 5 días de incubación, los cuerpos elementales incrementan en número para formar inclusiones citoplasmáticas inmaduras de 1,0 a 2,5 μm de diámetro, denominadas cuerpos iniciales. Durante los próximos 7 a 12 días, continúa el crecimiento y la división celular para formar finalmente las mórulas, cuerpos de inclusión maduros característicos del género *Ehrlichia*, visibles al microscopio de luz y miden aproximadamente 4 μm de diámetro. Las mórulas se fragmentan en cuerpos elementales y cuando la célula se rompe son liberados, infectando otras células, repitiéndose el ciclo (Figura 1).

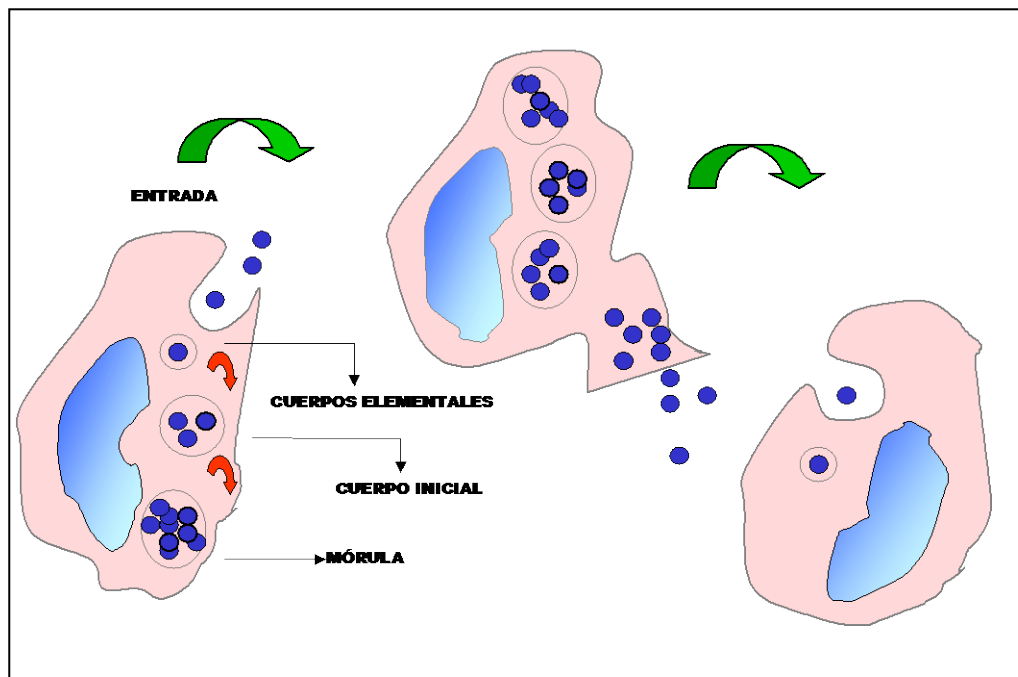


Figura 1. Ciclo evolutivo (McDade, 1990 modificado por Martínez y Gutiérrez, 2000)

1.4 Características ultraestructurales

Con la utilización del microscopio electrónico de transmisión se puede observar en detalle estructuras en el interior de las células, debido a su gran resolución y magnificación (Meek y Wiley, 1970), por lo que desde su invención en 1933 se han logrado estudiar los diferentes organelos celulares como también evidenciar las características de los microorganismos de vida intracelular obligatoria. En el caso particular de las Ehrlichias el uso de esta metodología ha permitido a través de sus características ultraestructurales ubicarlas taxonómicamente a nivel de género (Ristic y Huxsoll, 1984).

En un estudio realizado por Hildebrant *et al.* (1973) se describen las características ultraestructurales de los cuerpos elementales contenidos en las mórulas intracitoplasmáticas de monocitos en cultivos celulares primarios infectados y células pulmonares de un perro inoculado experimentalmente con *E. canis*. Los cuerpos elementales midieron entre 0,5-0,9 μm de diámetro y estaban presentes en un número que varió de 2 a 40 por vacuola. Estos investigadores determinaron que los cuerpos elementales estaban rodeados por una doble membrana destacando que la membrana externa tiende a ser ondulada y corresponde a la pared celular y la membrana interna equivale a la membrana plasmática de la bacteria. En cuanto al contenido interno del cuerpo elemental, señalan que además de las áreas electrondensas también se observan áreas electronlúcidas o claras en donde las primeras contienen gránulos que sugieren ser ribosomas.

Gutiérrez *et al.* (1999), reportan por primera vez en Sur América y Venezuela las características ultraestructurales que identifican al género *Ehrlichia* en células mononucleares de un perro infectado experimentalmente. En estas células se logró evidenciar vacuolas que contenían de 3 a 20 cuerpos elementales ovalados entre 0,6 μm x 0,3 μm a 1,2 μm x 0,5 μm , también se observaron formas redondeadas entre 0,4 μm y 0,7 μm de diámetro. Las características de la membrana externa e interna de los cuerpos elementales son muy semejantes a las reportadas por Hildebrant *et al.* (1973).

Se ha determinado la ultraestructura de *E. platys* en plaquetas de perros infectados (Tamí *et al.*, 1996; Arraga-Alvarado *et al.*, 1997; Mathew *et al.*, 1997). Las plaquetas pueden incluir de 1 a 3 mórulas y cada una de éstas contiene entre 1 y 8 cuerpos elementales. Los cuerpos elementales presentaron las mismas características descritas en los estudios anteriores.

1.5 Generalidades históricas

Las Ehrlichias fueron observadas microscópicamente por primera vez en el año 1932 en la garrapata *Ixodes ricinus* y para ese entonces se les designó con el nombre *Cytoecetes phagocytophila*. Ese mismo año se describió en carneros la fiebre transmitida por garrapatas, enfermedad atribuida a estos microorganismos reconocidos en 1982 como *Ehrlichia phagocytophila* (Fishbein y Dawson, 1991).

En 1935, Donatien y Lestoquard del Instituto Pasteur de Argelia (citados por McDade, 1990) visualizaron en monocitos de perros organismos semejantes a rickettsias, por lo que fueron clasificados como *Rickettsia canis*. En 1945 Moshovski los reclasificó como *Ehrlichia canis* en honor a Paul Ehrlich, bacteriólogo alemán, con lo que se estableció un nuevo género diferente a *Rickettsia* (Ristic y Huxsoll, 1984; McDade, 1990).

En 1953 Misao y Kobayashi (citados por McDade, 1990), identifican el primer caso de Ehrlichiosis en humanos al aislar en ratones un agente similar a una *Rickettsia*, el cual observaron en un paciente con síntomas de mononucleosis en una ciudad de Japón, clasificada provisionalmente como *Rickettsia sennetsu*. Tomando en cuenta el estudio realizado por Hoilien *et al.* (1982) en el que demostraron semejanzas desde el punto de vista morfológico y serológico de esta *Rickettsia* con *E. canis*, Ristic y Huxsoll (1984), la ubican taxonómicamente en el género *Ehrlichia* y desde entonces se conoce como *Ehrlichia sennetsu*.

En el hemisferio Occidental, Bool y Sutmöller (1957), identifican el primer caso de infección por *E. canis* en frotis sanguíneos de perros de la isla de Aruba. En Estados Unidos, Ewing (1963), la visualiza en leucocitos vistos en frotis sanguíneos de perros. En

este mismo país Maeda *et al.* (1987), reportan el primer caso de Ehrlichiosis Monocítica Humana al observar en el frotis sanguíneo de un paciente febril, cuerpos de inclusión intraleucocitarios. Para ese momento, se pensó que podría tratarse de *E. canis* por la semejanza morfológica, ultraestructural y por la reacción positiva del suero de este paciente con antígeno de *E. canis*, pero luego Anderson *et al.* (1991), después de analizar la secuencia de nucleótidos del gen ARNr 16S demostraron que era una especie diferente a la que propusieron con el nombre de *Ehrlichia chaffeensis*.

En un estudio realizado en Venezuela, (estado Zulia), Arraga-Alvarado (1992), reporta por primera vez en Frotis de Capa Blanca Ehrlichias en leucocitos y plaquetas de perros; a partir de entonces la presencia de las Ehrlichias en perros ha sido registrada en los estados Aragua, Lara, Carabobo, Falcón, Miranda, Nueva Esparta y Distrito Federal (García *et al.*, 1992; Tamí *et al.*, 1994; De Vera y Pereira, 1998; García *et al.*, 1999). Arraga-Alvarado *et al.* (1996), describen el primer caso de Ehrlichiosis humana en una niña de 17 meses diagnosticado en el CDC de Atlanta, Estados Unidos mediante IFI utilizando Ag de *E. chaffeensis*.

2. Ehrlichiosis Canina

La Ehrlichiosis Canina es una enfermedad multisistémica causada por varias especies de Ehrlichias. En el perro se han descrito Ehrlichias con tropismo por varias células sanguíneas: *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. risticii* parasitan linfocitos y monocitos, *E. ewingii* y *E. equi* (*Anaplasma phagocytophila*) neutrófilos y eosinófilos y *E. platys* las plaquetas (Kakoma *et al.*, 1994; Dawson *et al.*, 1996a; Breitschwerdt *et al.*, 1998; Neer, 2000). De todas estas Ehrlichias la más estudiada y la que en algunos perros produce el cuadro clínico más severo es *E. canis*. Esta especie afecta a miembros de la familia *Canidae* y también ha sido reportada como causante de infección persistente en un humano asintomático del estado Lara de Venezuela (Anderson *et al.*, 1992a; Pérez *et al.*, 1996). La enfermedad producida por *E. canis* también se conoce como Pancitopenia Tropical Canina, Fiebre Hemorrágica Canina, Rickettsiosis Canina, Tifus por Garrapata Canina, Enfermedad

del Perro Rastreador y Ehrlichiosis Monocítica Canina (Price y Sayer, 1983; Harrus *et al.*, 1997).

2.1 Patogenia y Patología

La infección del perro ocurre cuando la garrapata infectada ingiere sangre y sus secreciones salivales contaminan el sitio donde se alimenta. De acuerdo a estudios experimentales, el curso subsiguiente de la Ehrlichiosis se ha dividido en tres etapas: aguda, subclínica y crónica; en los casos en que ocurre la enfermedad en forma natural es difícil asignar con precisión la etapa de la enfermedad (Harrus *et al.*, 1997; Neer, 2000).

La fase aguda se inicia después de un período de incubación de 8 a 20 días y dura de dos a cuatro semanas, durante las cuales los microorganismos se multiplican en las células mononucleares. La infección se disemina a órganos que contienen fagocitos mononucleares, como el hígado, bazo y nódulos linfáticos y las células infectadas se adhieren aparentemente al endotelio o migran a la superficie subendotelial produciendo vasculitis (Hibler, *et al.*, 1986; Troy y Forrester, 1993; Harrus *et al.*, 1997; Neer 2000).

La disminución de las plaquetas causa trombocitopenia, siendo este el hallazgo más común en todas las fases de la Ehrlichiosis Canina. Varios mecanismos pueden estar involucrados, entre los que se puede mencionar: vasculitis, incremento del consumo plaquetario y disminución de la vida media, tal vez como resultado de secuestro esplénico. Es posible que estén involucrados anticuerpos antiplaquetarios con activación del complemento, además se ha demostrado la presencia de una citocina sérica, denominada factor inhibidor de la migración plaquetaria y su valor se relaciona de manera inversa con la cifra de plaquetas. Otros mecanismos podrían incluir almacenamiento esplénico, supresión de la producción plaquetaria (especialmente en la fase crónica) e incremento de la destrucción plaquetaria por los macrófagos del bazo (Troy y Forrester, 1993; Harrus *et al.*, 1997; Neer, 2000).

El número de leucocitos varía durante la fase aguda, sin embargo, el aumento del secuestro de los leucocitos circulantes por mecanismos inmunológicos o inflamatorios puede disminuir su número. También llega a verse una menor producción de glóbulos rojos como resultado de la respuesta inflamatoria (Troy y Forrester, 1993).

Los órganos como pulmones, riñones, vejiga y tracto gastrointestinal así como en el tejido subcutáneo, presentan petequias y equimosis en las superficies mucosas y serosas. A menudo se presentan adenomegalia generalizada, esplenomegalia y hepatomegalia. El dato más característico es la presencia de un infiltrado de células plasmáticas perivasculares en órganos como pulmones, cerebro, meninges, riñones, ganglios linfáticos y bazo, por lo tanto los tejidos de estos órganos son ideales para realizar los exámenes histológicos. Todos los ganglios linfáticos, incluyendo los mesentéricos, aumentan de tamaño y tienen color café. La médula ósea es hipercelular y de color rojo, mientras que en la etapa crónica se torna hipoplásica y pálida por sustitución grasa (Huxsoll *et al.*, 1970; Hibler *et al.*, 1986).

La fase subclínica tiene una duración de 40 a 120 días; es antecedida por la recuperación espontánea del animal a la etapa aguda, por lo que clínicamente tiene una apariencia normal. Un alto porcentaje de perros en áreas enzoóticas pueden padecer la enfermedad y mantenerse en esta fase durante meses o años; esta etapa se relaciona con la persistencia del microorganismo y estimulación antigénica; hay algunos perros inmunocompetentes que pueden eliminar la Ehrlichia, pero de no ser así puede seguir la fase crónica (Hibler *et al.*, 1986; Troy y Forrester, 1993; Neer, 2000).

No todos los perros desarrollan la fase crónica, y esta puede ser leve o severa; la fase leve puede manifestarse con cambios hematológicos moderados. La gravedad de la enfermedad se relaciona con la virulencia de la cepa infectante, enfermedades concomitantes, susceptibilidad de la raza y edad del animal. La principal característica de esta fase es la producción alterada de elementos sanguíneos en médula ósea (Troy y Forrester, 1993; Harrus *et al.*, 1997; Neer, 2000). Hay una diferencia entre la patogénesis de la Ehrlichiosis aguda y la crónica severa. En la Ehrlichiosis aguda hay un incremento del secuestro o destrucción de las células sanguíneas, lo cual resulta en una pancitopenia

transitoria, mientras que la médula ósea permanece normal, sin embargo, en la Ehrlichiosis crónica, la pancitopenia está asociada con hipoplasia de la médula ósea (Price y Sayer, 1983).

2.2 Manifestaciones clínicas

La infección producida por *E. canis* está asociada a una amplia variedad de manifestaciones clínicas que van a depender de varios factores, entre ellos: dosis de Ehrlichias y actividad del sistema inmunológico del individuo; por lo tanto se pueden observar desde casos con ausencia de signos clínicos (asintomáticos), otros con malestar moderado e inapetencia, llegando a casos graves y algunas veces fatales (Price y Sayer, 1983; Arraga-Alvarado, 1997). La severidad de la enfermedad ha sido relacionada con la raza del perro infectado; se ha reportado que los Pastores Alemanes frecuentemente son los más susceptibles a desarrollar la fase hemorrágica crónica (Huxsoll *et al.*, 1970; Walker *et al.*, 1970; Buhles *et al.*, 1974; Rikihisa, 1991; Troy y Forrester, 1993).

La fase aguda está caracterizada por fiebre que puede alcanzar los 41,7 °C, anorexia, pérdida de peso, conjuntivitis, descargas nasales y oculares seropurulentas. Menos frecuentemente neumonitis, edema en las patas y escroto, ocasionalmente vómito y epistaxis moderada. Al examen físico, se puede observar palidez de las mucosas, esplenomegalia y agrandamiento de nódulos linfáticos. Ocasionalmente se observan cuerpos de inclusión en el citoplasma de las células mononucleares sanguíneas (Huxsoll *et al.*, 1970; Walker *et al.*, 1970; Buhles *et al.*, 1974; Price y Sayer, 1983; Troy y Forrester, 1993).

En la fase subclínica generalmente los signos clínicos están ausentes, sin embargo, las anormalidades hematológicas características de la fase aguda persisten, a los cuales se agrega la hipergammaglobulinemia, así como incrementos en los valores de nitrógeno ureico sanguíneo (Hibler *et al.*, 1986; Conrad, 1989).

El desarrollo de la fase crónica puede variar según la raza. Los perros Beagles se hacen portadores crónicos de *E. canis* y experimentan disminuciones cíclicas y moderadas

del contaje de células sanguíneas; por otro lado los Pastores Alemanes desarrollan una infección crónica severa que comienza a las 7 semanas postinfección. Esta fase se caracteriza por fiebre, anorexia, pérdida de peso severa, marcada pancitopenia y anemia; también puede observarse edema periférico, equimosis y petequias en múltiples sitios (Huxsoll *et al.*, 1970; Buhles *et al.*, 1974). La tendencia a las hemorragias, linfadenopatía, esplenomegalia, anormalidades oculares e infecciones secundarias son consideradas indicadores de la Ehrlichiosis crónica (Conrad, 1989; Troy y Forrester, 1993).

2.3 Inmunidad

Todos los agentes Ehrlichiales inducen una respuesta específica de anticuerpos aunque la misma no se correlaciona con el desarrollo de inmunidad protectora, ya que se ha reportado en varias especies infecciones persistentes y recurrentes o reinfecciones después de la recuperación de la enfermedad clínica. Los perros que se recuperan clínicamente después del tratamiento a pesar de poseer títulos de anticuerpos significativamente altos son totalmente susceptibles al reto con cepas de *E. canis*. Se ha reportado que *in vitro* el suero canino inmune suprime ligeramente la infección de macrófagos normales por *E. canis* pero en condiciones *in vivo* el suero no es efectivo (Rikihis, 1991).

Weisiger *et al.* (1975) al estudiar la cinética de la respuesta de los anticuerpos a *E. canis* por Inmunofluorescencia Indirecta, encontraron que a los 7 días postinoculación las primeras inmunoglobulinas en detectarse fueron la IgM e IgA. Entre los 14 y 21 días postinoculación los anticuerpos predominantes eran las clases IgM, IgA e IgG y esta última sigue aumentando hasta convertirse en la inmunoglobulina de mayor concentración.

2.4 Transmisión

Se ha demostrado que las larvas, ninfas y adultos de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, sirven de vector para *E. canis*, transmitiendo esta Ehrlichia de un perro infectado en fase aguda a otro perro susceptible. La forma adulta de la garrapata puede sobrevivir de 158 a 568 días sin alimento, y experimentalmente se ha demostrado que una

vez infectada, puede transmitir la infección y la enfermedad hasta por 155 días. Por lo tanto, las garrapatas infectadas constituyen un foco enzoótico de *E. canis* en ausencia del vertebrado infectado. La transmisión también puede ocurrir a través de transfusión sanguínea de un perro en fase aguda o fase crónica de la enfermedad a otro susceptible (Groves *et al.*, 1975; Lewis *et al.*, 1977; Arraga, 1992).

2.5 Tratamiento

Para el tratamiento de la Ehrlichiosis Canina se han sugerido una variedad de agentes quimioterapéuticos, los cuales han sido utilizados con diferentes grados de éxito, entre ellos se describen: el dipropionato de imidocarb, varias sulfonamidas y antibióticos que incluyen la penicilina, el cloranfenicol y las tetraciclinas. Estas últimas y sus derivados son los antibióticos más efectivos clínicamente y los más ampliamente usados, siempre y cuando se administren en la fase aguda de la enfermedad, ya que si se aplican en la fase crónica, el animal se hace refractario y al final muere (Price y Sayer, 1983; Iqbal y Rikihisa, 1994).

La doxiciclina es una tetraciclina, derivado sintético de la metaciclina que se diferencia de la oxitetraciclina por que tiene un mayor grado de liposolubilidad. A nivel del tracto gastrointestinal la absorción es completa y después de ésta, el antibiótico está 30% unido a las proteínas y penetra bien en los tejidos. La depuración renal de la doxiciclina es menor a la de la oxitetraciclina, lo cual puede atribuirse a su alto grado de liposolubilidad. La doxiciclina tiene una vida media de 19,5 horas en comparación con la vida media de la oxitetraciclina que es de 9,5 horas; por estas razones, actualmente, es el tratamiento más utilizado a una dosis de 5 a 10 mg/kg de peso corporal, administrada por vía oral cada 12 o 24 horas por 7 a 10 días (Price y Sayer, 1983; Iqbal y Rikihisa, 1994).

3. Diagnóstico

El diagnóstico de la Ehrlichiosis Canina suele establecerse basándose en una combinación de signos clínicos y hallazgos de laboratorio como anormalidades

hematológicas, trombocitopenia, visualización de la Ehrlichia en frotis sanguíneos, serología y más recientemente la prueba de la PCR. Las alteraciones hematológicas se comprueban mejor en infecciones por *E. canis* e incluyen anemia (82 %), la cual suele ser no regenerativa, trombocitopenia (82 %) y leucopenia (32 %). Un resultado que se ha publicado constantemente en todas las etapas de la Ehrlichiosis por *E. canis* es la trombocitopenia; sin embargo, debido a que con frecuencia es una prueba de selección para Ehrlichiosis, es posible que se haya sobreestimado esta proporción, por lo que no debe descartarse Ehrlichiosis solo por que el recuento plaquetario resulte normal (Neer, 2000).

3.1 Frotis de Capa Blanca (FCB)

Entre los métodos de laboratorio para el diagnóstico de la Ehrlichiosis en el perro, el más utilizado es la observación directa de las inclusiones intracitoplasmáticas en extendidos sanguíneos o en FCB teñidos con coloraciones tipo Romanowski, siendo el FCB la forma más recomendada, ya que concentra los leucocitos y plaquetas, después que se somete a centrifugación una muestra de sangre en un capilar para microhematocrito o en un tubo de Wintrobe (Huxsoll *et al.*, 1970; Harvey *et al.*, 1978; Price y Sayer, 1983; Arraga, 1992; Gutiérrez *et al.*, 1999). A pesar de que es un método de fácil ejecución y económico requiere de personal muy entrenado en el reconocimiento de las inclusiones y muchas veces la fagocitosis de plaquetas y de restos nucleares puede confundir el diagnóstico de las Ehrlichias monocíticas. Por otro lado, es un método con una sensibilidad muy baja, reportándose en un estudio realizado con 221 perros con Ehrlichiosis, evidencia de mórulas típicas de Ehrlichia Monocítica en un 4 % de los perros estudiados (Rikihisa, 1991; Harrus *et al.*, 1997).

Se ha reportado la utilidad del FCB en la etapa aguda de la enfermedad y sobre todo para Ehrlichias con tropismo por granulocitos (*E. ewingii*, *E. equi*) y plaquetas (*E. platys*). En Ehrlichias con tropismo por células mononucleares se han observado dos tipos de mórulas (Figura 2), las mórulas difusas constituidas por cuerpos iniciales que están en proceso de agregación y las mórulas compactas que se observan como una sola inclusión basófila (Huxoll *et al.*, 1970; Harrus *et al.*, 1997; Gutiérrez *et al.*, 1999).

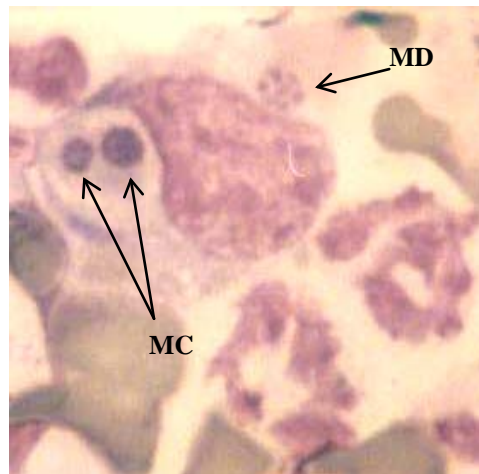


Figura 2. Monocito con mórula difusa (MD) y dos mórulas compactas (MC). FCB teñido con Giemsa. 1000X. (Gutiérrez *et al.*, 1999).

3.2 Diagnóstico serológico

El método serológico más empleado, es la detección de anticuerpos (Acs) por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), método desarrollado por Ristic *et al.* (1972) obteniendo el antígeno (Ag) en cultivos primarios de monocitos caninos infectados con *Ehrlichia canis* de acuerdo a la metodología reportada por Nyindo *et al.* (1971).

Años más tarde se logró establecer el cultivo de *E. canis* y *E. chaffeensis* en la línea celular continua DH82, con la ventaja de que estos cultivos se podían mantener por tiempo indefinido en el laboratorio (Dawson *et al.*, 1991a, b). También se tienen establecidos en líneas celulares continuas los cultivos de *E. risticii*, *E. equi* y Ehrlichia Granulocítica Humana (Rikihisa, 1991; Munderloh *et al.*, 1996; Goodman *et al.*, 1996).

Entre otros métodos serológicos utilizados a nivel de investigación se ha reportado el Ensayo Inmunoenzimático (E.L.I.S.A.) e Inmunoblot para el diagnóstico de *E. canis*, *E. ewingii* y *E. equi* (Brouqui *et al.*, 1992; Rikihisa *et al.*, 1992).

3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En los últimos 20 años los avances en la tecnología de los ácidos nucleicos han brindado una serie de elementos y pruebas para el diagnóstico de algunas enfermedades infecciosas y genéticas. Una de estas pruebas es la PCR, que constituye un ingenioso método que permite la amplificación (aumento del número de copias) *in vitro* del ADN de células o microorganismos sin necesidad de cultivos previos. Sin embargo, un requisito indispensable es que se conozca la secuencia de una parte de la región del ADN que se desea amplificar (Espinosa de los Monteros, 1993; Luque y Herráez, 2001).

Para la realización práctica se precisan en la mezcla de reacción de los siguientes reactivos: los cuatro deoxinucleósidos trifosfato (dNTPs), iones Mg^{2+} , dos oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores de secuencia conocida y diferentes entre ellos, una ADN polimerasa termoestable y el ADN que va a actuar como plantilla o molde para la síntesis de nuevas cadenas; los dNTPs y oligonucleótidos están en exceso. Cada uno de estos componentes tiene una función en el desarrollo del proceso; los dNTPs actúan como monómeros activados necesarios para la polimerización de las innumerables copias de ADN. La interacción entre los oligonucleótidos y la plantilla de ADN es estabilizada por los iones Mg^{2+} . Estos iones también participan en el proceso de síntesis o extensión de los cebadores, además de una ADN polimerasa. La enzima más utilizada es la polimerasa *Taq* nombre que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus*, la cual se encuentra en manantiales de agua caliente, con una actividad enzimática a temperaturas óptimas relativamente altas alrededor de 72 °C (Taylor, 1991; Luque y Herraéz, 2001). El proceso se lleva a cabo a través de ciclos repetitivos (generalmente entre 20 y 40 de 1,5 a 5 minutos cada uno) de tres reacciones simples o etapas: la desnaturalización, la hibridación o alineación y la elongación o replicación utilizando cambios de temperatura (Espinosa de los Monteros, 1993; Luque y Herráez, 2001).

En la primera etapa de desnaturalización ocurre la separación de las dos hebras de ADN al romperse los puentes de hidrógeno por efecto de la temperatura alta (90-95 °C). En la segunda etapa la temperatura disminuye entre 45 a 65 °C lo cual permite la hibridación

de los oligonucleótidos con las hebras sencillas del ADN. Debido a que las dos cadenas de ADN son antiparalelas, los oligonucleótidos que se unen a cada una de las dos cadenas, lo hacen en posiciones opuestas, uno en un extremo de una cadena y el otro en el extremo opuesto de la otra cadena. La temperatura de la tercera y última etapa es por lo general entre 72 a 75 °C y corresponde a la amplificación propiamente dicha, en la que una ADN polimerasa termoestable elonga los cebadores, empleando como molde ambas hebras originales. Este ciclo se repite muchas veces y debido a que los productos generados en un ciclo sirven de plantilla para el próximo, cada ciclo sucesivo duplica la cantidad de ADN que se desea amplificar; la longitud del principal producto de esta reacción exponencial está definida por la distancia entre los dos cebadores (Sambrook *et al.*, 1989; Espinosa de los Monteros, 1993; Luque y Herráez, 2001).

El método más simple y convencional para analizar los productos de la PCR es por electroforesis a través de minigeles de agarosa. Se debe escoger la concentración de agarosa para permitir la resolución de los fragmentos de ADN dentro del rango del tamaño de los productos esperados. Aproximadamente 1-2 % para productos mayores a 500 pares de base (pb) y 2-4 % para productos menores a 500 pb (Mcpherson *et al.*, 1991).

Han surgido numerosas modificaciones derivadas del método básico inicial con el objetivo de mejorar la sensibilidad y/o la especificidad, adaptarse a muestras particulares, amplificar moléculas de ARN en lugar de ADN, etc. Una de estas modificaciones corresponde a la PCR anidada, la cual se realiza con la finalidad de aumentar la sensibilidad y especificidad. Esta modalidad consiste en realizar dos reacciones de PCR en la que los cebadores de la segunda PCR hibridizan dentro del fragmento amplificado con el primer par de cebadores, dando así lugar a productos de PCR más cortos pero más específicos (Jackson *et al.*, 1991; Luque y Herráez, 2001).

3.3.1 Extracción del ADN

Antes de realizar una reacción de PCR es necesario liberar al ADN de proteínas estructurales además de otras proteínas, lípidos y polisacáridos presentes en la muestra biológica. El procedimiento de extracción más utilizado es mediante la aplicación de

disolventes orgánicos, pero cuando el ADN forma parte de una mezcla compleja de moléculas como por ejemplo tejidos, suspensiones celulares, previamente se deben remover las proteínas por degradación enzimática con enzimas proteolíticas como la proteinasa K, la cual tiene actividad hacia una gran cantidad de proteínas nativas (Sambrook *et al.*, 1989; Luque y Herráez, 2001).

La extracción del ADN de la muestra homogeneizada se realiza tratándola con disolventes orgánicos como el fenol, cloroformo o ambos; estos compuestos permiten la formación de dos fases en el tubo donde se está llevando a cabo el proceso: una fase acuosa poco densa y por lo general ubicada en la parte superior en la cual queda disuelto el ADN y una fase orgánica densa y ubicada en la parte inferior donde permanecen los lípidos de membrana y proteínas desnaturalizadas; en la interfase se encuentran proteínas precipitadas (Luque y Herráez, 2001) .

Obtenida la fase acuosa con el ADN disuelto es necesario concentrarlo. Para ello se realiza una precipitación con etanol, ya que en presencia de este alcohol el ADN es insoluble. El ADN precipitado se recupera por centrifugación y posterior redisolución en un buffer apropiado (Sambrook *et al.*, 1989; Luque y Herráez, 2001).

Luego de obtenido el ADN es importante conocer su concentración y calidad. Hay dos métodos ampliamente utilizados para medir la cantidad de ADN en una muestra. Si la muestra de ADN no tiene muchas impurezas como proteínas o fenol se mide espectrofotométricamente la irradiación ultravioleta absorbida por las bases. Si la cantidad de ADN es muy pequeña o si la muestra contiene cantidades significativas de impurezas se puede utilizar la fluorimetría midiendo la intensidad de la fluorescencia emitida por un colorante como el bromuro de etidio o naranja de acridina (Sambrook *et al.*, 1989; Jackson *et al.*, 1991).

Determinación espectrofotométrica de la cantidad de ADN

Por este método se realiza la medición a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. La lectura a 260 nm permite calcular la concentración de ADN, ya que la densidad óptica igual a 1,0 corresponde aproximadamente a 50 µg/ml para ADN de doble cadena. La pureza se puede estimar por la relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm (A_{260}/A_{280}); para considerar que una muestra de ADN está relativamente pura la relación debe estar comprendida entre 1,7 y 1,9. Valores por debajo del límite inferior indican contaminación con proteínas o fenol y valores por encima del límite superior significa contaminación con ARN (Sambrook *et al.*, 1989).

3.3.2 La prueba de la PCR como herramienta para la identificación de bacterias

La clasificación taxonómica tradicional de los diferentes organismos vivos, entre ellos las bacterias, se ha realizado tomando en cuenta las características fenotípicas, pero para hacerlo de esta forma es indispensable obtener cultivos *in vitro*. Sin embargo, hay una serie de microorganismos patógenos que aunque los visualizamos en las muestras biológicas, su aislamiento y propagación en el laboratorio ha resultado infructuosa, por lo que su clasificación e identificación no había sido posible. No obstante, gracias al desarrollo de técnicas en biología molecular a mediados de los años 80 se propuso una nueva forma para clasificar los organismos vivos, la cual se basa en la secuenciación del ADN, para lo cual se debía escoger una región del genoma que permitiera diferenciar los distintos grupos taxonómicos (Relman, 1993; Madigan *et al.*, 1997).

Para establecer las relaciones evolutivas entre los organismos vivos se escogieron los ARN ribosomales (ARNr) como excelentes moléculas diferenciales debido a que la síntesis de proteínas es un proceso de evolución ancestral y además los ARNr son moléculas antiguas, funcionalmente constantes, presentes en todos los organismos vivos y moderadamente bien conservadas (Madigan *et al.*, 1997).

Los ribosomas de los procariotas tienen dos subunidades de 50S y 30S formadas por complejos de nucleoproteínas. La subunidad 30S está constituida por el ARNr 16S con alrededor de 1.500 nucleótidos y aproximadamente 21 proteínas y la subunidad 50S está formada por los ARNr 23S y 5S con aproximadamente 2.900 y 120 nucleótidos respectivamente y alrededor de 34 proteínas. Las moléculas ARNr 16S y ARNr 23S contienen varias regiones de secuencias altamente conservadas útiles en estudios de hibridación. También contienen otras regiones con suficiente variabilidad de secuencias que sirven como excelentes marcadores filogenéticos para diferenciar especies bacterianas dentro de un género y géneros dentro de una familia. La molécula ARNr 5S también ha sido utilizada para estudios de relaciones filogenéticas pero su pequeño tamaño ha limitado la información obtenible de esta molécula (Wilson *et al.*, 1990; Relman, 1993; Madigan *et al.*, 1997)

En los estudios de relaciones filogenéticas entre los procariotas ha resultado más fácil la utilización de la molécula ARNr 16S que la molécula ARNr 23S debido a que la primera molécula tiene menos nucleótidos. Al principio cuando se comenzaron a realizar estos estudios se secuenciaba el ARNr extraído de una cierta cantidad de bacterias cultivadas, mediante una transcriptasa reversa pero luego se idearon cebadores universales que amplifican por PCR el gen que codifica el ARNr 16S y posteriormente se secuencian, por lo que fue posible identificar y clasificar bacterias que no han sido cultivadas. Entre algunos ejemplos se puede mencionar: en humanos la enfermedad de Whipples, cuyo agente etiológico es el bacilo *Tropheryma whippelii*, *Helicobacter pylori* asociado a gastritis, entre otros. En la Figura 3 está representado el operón *rrn* de la bacteria *Escherichia coli*, dentro del cual se encuentra el gen ARNr 16S (Wilson *et al.*, 1990; Relman, 1993; Lewin, 1996; Madigan *et al.*, 1997).

Anderson *et al.* (1991) desarrollaron por primera vez la técnica de PCR para la identificación de bacterias del género *Ehrlichia* utilizando dos pares de cebadores universales, los cuales amplifican aproximadamente el 90 % del gen ARNr 16S con productos de 733 y 767 pb para cada par. Después de analizar molecularmente a *E. canis* (dos cepas), *E. equi*, *E. phagocytophila* (dos cepas), *E. sennetsu* y el agente etiológico de la

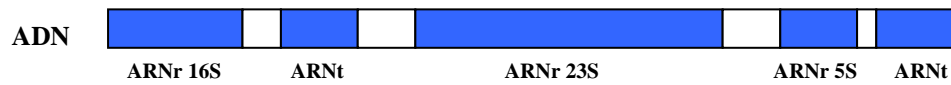


Figura 3. Representación esquemática del operón *rrn*

Ehrlichiosis Monocítica Humana encontraron diferencias entre este agente y las demás especies analizadas por lo que propusieron el nombre de *E. chaffeensis* para este nuevo agente.

Anderson *et al.* (1992b) realizaron una PCR convencional con los cebadores: HE1 (5'-CAATTGCTTATAACCTTTTGGTTATAAAT-3') y HE3 (5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3') y los cebadores HE1 y ECA (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3') que amplifican un fragmento en el gen ARNr 16S para la especie *E. chaffeensis* agente etiológico de la Ehrlichiosis humana, para los primeros cebadores y *E. canis* para los dos últimos cebadores; esta PCR resultó muy específica con un producto de aproximadamente 389 pb para ambas especies.

Debido a la baja sensibilidad de la PCR convencional anterior Dawson *et al.* (1994), desarrollaron una PCR anidada utilizando en una primera amplificación los cebadores: ECC (5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3') y ECB (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3') para obtener una región del gen ARNr 16S correspondiente a la mayoría de las especies *Ehrlichia* sp. y de otras bacterias que no pertenecen al género *Ehrlichia* cuyo producto no se visualizó en la electroforesis del gel de agarosa. En una segunda amplificación, se utilizó como ADN molde el producto obtenido de la primera PCR y los cebadores para la especie *E. chaffeensis* HE1 y HE3 se observó un producto de aproximadamente 389 pb.

Además de *E. canis*, se ha logrado identificar en el perro tanto por la técnica de PCR convencional como anidada a *E. chaffeensis*, *E. risticii*, *E. ewingii*, *E. equi* y *E. platys* (Anderson *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1992a; Iqbal *et al.*, 1994; Kakoma *et al.*, 1994; Dawson *et al.*, 1996a; Mathew *et al.*, 1997 Breitschwerdt *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 1998).

4. Cultivo *in vitro* de *Ehrlichia* sp.

Las bacterias del género *Ehrlichia* por su característica de organismos intracelulares obligatorios no han podido ser cultivadas en medios libres de células, ni siquiera en saco vitelino de embrión de pollo. El mantenimiento de estas bacterias *in vitro* se ha logrado en cultivos celulares, aunque de poco valor práctico como método diagnóstico de rutina debido al tiempo requerido para ello (Ristic y Huxsoll, 1984; Rikihisa, 1991).

En este sentido Nyindo *et al.* (1971), lograron aislar por primera vez *E. canis* en cultivos primarios de monocitos caninos *in vitro* a partir de plasma rico en leucocitos de un perro con Ehrlichiosis Canina; mediante este cultivo se pudo caracterizar las diferentes formas evolutivas de estas bacterias. Luego se establecieron cultivos primarios de monocitos caninos *in vitro* en forma seriada con el inconveniente de que se necesitaban perros clínicamente sanos como fuente de monocitos para realizar los pases debido a que los cultivos primarios son de corta duración (Hemelt *et al.*, 1980).

Posteriormente se estableció la línea celular continua DH82 de macrófagos a partir de células neoplásicas de un perro con histiocitosis maligna (Wellman *et al.*, 1988). Esta línea celular se presentaba como una buena alternativa para el aislamiento de las Ehrlichias Monocíticas ya que se podía mantener *in vitro* en forma indefinida; por lo tanto a partir de cultivos primarios de monocitos caninos infectados, Dawson *et al.*, (1991b), establecieron el cultivo de *E. canis* en esta línea celular. En esta misma línea celular continua se logró por primera vez el aislamiento de *E. chaffeensis*, agente etiológico de la Ehrlichiosis humana, a partir de la sangre obtenida de 24 pacientes con signos y síntomas clínicos de Ehrlichiosis. Para ello se obtuvieron los leucocitos por un gradiente de separación y se sembraron directamente en la monocapa de la línea celular. El aislamiento se logró en uno de los 24 pacientes (Dawson *et al.*, 1991a). Keysary *et al.* (1996) aislaron por primera vez *E. canis* en Israel en la línea celular continua DH82; para lograr el cultivo primero establecieron cultivos primarios de monocitos y luego con estos cultivos infectaron la línea celular continua.

Se han reportado varias formas de infectar la línea celular DH82 tanto con *E. chaffeensis* como con *E. canis*, entre las que se puede mencionar: a partir de células mononucleares infectadas obtenidas por un gradiente de separación y por leucocitos infectados libres de glóbulos rojos aplicando un buffer de lisis, entre otras (Iqbal *et al.*, 1994; Lockhart *et al.*, 1997). Brouqui *et al.* (1994), adaptaron *E. chaffeensis* en las líneas celulares HEL299 (fibroblastos embrionarios de pulmón humano), VERO (células de riñón de mono verde) y HeLa (células de carcinoma epiteloide cervical humano).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología implementada en este trabajo consistió en:

1. Aislamiento de Ehrlichia Monocítica Canina a partir de perros infectados natural y experimentalmente:
 - a) Sembrando directamente las células de perros infectados naturalmente en la línea celular DH82 cultivadas *in vitro*
 - b) En cultivos primarios *in vitro* de monocitos obtenidos de un perro infectado experimentalmente
2. Detección de Ehrlichia Monocítica Canina en los cultivos *in vitro* mediante coloración de Giemsa e Inmunofluorescencia Directa
3. Identificación ultraestructural de *Ehrlichia* sp. en monocitos de perros
4. Identificación de *Ehrlichia canis* y *E. chaffeensis* por PCR

1. Aislamiento de Ehrlichia Monocítica Canina a partir de perros infectados natural y experimentalmente

El aislamiento y la propagación de las Ehrlichias Monocíticas (*E. canis* y *E. chaffeensis*) se ha logrado en la línea celular continua DH82 (Dawson *et al.*, 1991a, b). Para la realización de esta investigación, la línea celular se adquirió comercialmente

de la American Type Culture Collection (ATCC CRL-10389). Antes de comenzar con los ensayos de aislamiento, se procedió a establecer el cultivo celular.

1.1 Establecimiento de la línea celular continua DH82

Para establecer el cultivo de la línea celular continua DH82 se procedió de acuerdo a la metodología descrita por Dawson *et al.* (1991b), con algunas modificaciones. Una vez descongelado el vial de células y por recomendaciones de la ATCC, se transfirieron 3×10^6 células a un tubo cónico de 15 ml con 10 ml de Medio Esencial Mínimo (MEM) con sales de Earle (Sigma Chemical Company), suplementado con 1,2 % de glutamina (200 mM) (Hyclone) y 6 % de suero fetal bovino (SFB) inactivado (Hyclone); además se añadió gentamicina a una concentración de 8 mg %. Se realizaron intentos de adaptación de la línea celular con MEM suplementado con suero canino inactivado, ya que algunos investigadores reportan en la literatura la suplementación del medio con suero canino al inicio del aislamiento (Dawson *et al.*, 1991b; Keysary *et al.*, 1996). Al principio se probó una relación suero canino: suero bovino 1:3, conservando un 15 % de suero total.

Después de 10 minutos de centrifugación a $61 \times g$ y descartado el sobrenadante, el concentrado celular se resuspendió en 5 ml de MEM. La suspensión celular fue añadida a un frasco de cultivo de tejidos de 25 cm^2 , completándose a 10 ml con medio de cultivo e incubándose a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ sin atmósfera de CO_2 . Diariamente se revisó al microscopio invertido para observar la formación de la monocapa y el medio de cultivo se cambió cada 48 a 72 horas.

Con la finalidad de calcular la fase de crecimiento celular en la que se debían utilizar las células para crío-conservarlas (fase logarítmica) y la fase en las que estaban listas para realizar subcultivos o ser infectadas (fase estacionaria), se estableció una curva de crecimiento celular. En el día cero (0) de la curva, se

sembraron 27 frascos de cultivo de 25 cm² con 3 x 10⁶ células cada frasco. Posteriormente se realizaron contajes celulares desde el tercer hasta el décimo día y otro al decimocuarto día del inicio del cultivo y se calcularon los porcentajes de viabilidad por triplicado, utilizándose para ello la cámara de Neubauer y el colorante supravital Azul Tripan.

Una vez establecida la fase estacionaria de la curva de crecimiento, se procedió a expandir la línea celular continua DH82. Para esto se descartó el medio viejo del frasco de cultivo y se añadió 5 ml de medio de cultivo nuevo; utilizando un policia (cell scraper) o tripsina se desprendió la monocapa celular. Luego de realizado el contaje celular se transfirieron 3 x 10⁶ células a frascos de cultivo de 25 cm². Las condiciones de incubación fueron las mismas a las descritas anteriormente, observándose diariamente al microscopio invertido hasta la formación de la monocapa.

Determinada la fase logarítmica de la curva de crecimiento celular, se procedió a realizar los ensayos para la crío conservación de las células. Se desprendió la monocapa de los cultivos que estaban en fase estacionaria y efectuado el contaje celular se sembraron 9 x 10⁶ células en frascos de cultivo de 75 cm² con las condiciones de incubación ya descritas. Cuando las células alcanzaron la fase logarítmica se procedió a desprenderlas para contarlas y resuspenderlas en medio crioprotector. Para realizar este procedimiento al principio se probó la metodología recomendada por la ATCC, con la concentración celular 5 x 10⁶ células/ml y el medio constituido por 5 % de Dimetil Sulfoxido (DMSO), 15 % de SFB y 80 % de MEM base; a este medio se le denominó medio conservador A. Debido a los resultados obtenidos con esta metodología se realizaron otros ensayos con la concentración celular 2,5 x 10⁶ células/ml y el mismo medio conservador A; además estas dos concentraciones celulares también se probaron con otros dos medios conservadores: el medio conservador B formado por 7% de DMSO, 20 % de SFB y

73 % de MEM base y el medio conservador C compuesto por 5 % DMSO, 45 % de SFB y 50 % de MEM base. Cada una de las concentraciones celulares se repartieron en viales crioconservadores con cada uno de los tres medios procediéndose a congelar en forma gradual, primero a -20 °C durante 2 horas como máximo, luego a -70 °C durante 72 horas como mínimo y finalmente los viales fueron almacenados en recipientes de nitrógeno líquido. Luego se procedió a descongelar y evaluar la viabilidad de las células a diferentes períodos de tiempo: una semana, dos semanas, un mes, dos meses, tres meses y seis meses.

1.2 Aislamiento de Ehrlichia Monocítica Canina directamente en la línea celular continua DH82 cultivada *in vitro*

Establecida la línea celular continua DH82 para el aislamiento del microorganismo en estudio, se procedió a diagnosticar Ehrlichia Monocítica Canina por medio de Frotis de Capa Blanca (FCB), a partir de perros con signos clínicos de Ehrlichiosis Canina, infectados naturalmente que asistieron a la consulta del Hospital de Pequeños Animales "Dr. Daniel Cabello" de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela (UCV) Núcleo Maracay. Para ello se colectó sangre de 9 perros, de los cuales 8 eran mestizos y uno de la raza Boxer. Una vez seleccionados los perros con signos clínicos y FCB en los que se observaran Ehrlichia Monocítica Canina, se procedió a seguir dos metodologías para obtener las células infectadas:

- a) Células mononucleares obtenidas por gradiente de Ficoll/Hypaque
- b) Leucocitos obtenidos después de la aplicación de un buffer de lisis

1.2.1 Extracción sanguínea

A tres de los 9 perros se les extrajo asépticamente 10 ml de sangre de la vena cefálica y fue distribuida de la siguiente manera: 4 ml con ácido etilendiamino tetracético (EDTA) para realizar hematología completa (Coulter electrónico 410), FCB y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y 6 ml con heparina, para obtención de células mononucleares a través de gradiente de Ficoll/Hypaque. La muestra de sangre para realizar la PCR fue transferida a viales y almacenada a -70 °C hasta su uso.

De otros tres perros se obtuvieron 20 ml de sangre con EDTA, 10 ml fueron utilizados para efectuar las determinaciones anteriormente mencionadas y los otros 10 ml se emplearon para llevar a cabo estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión. A los últimos tres perros se les extrajo aproximadamente 35 ml de sangre repartidos como se menciona a continuación: entre 4 ml a 5 ml con EDTA para realizar las pruebas hematológicas, FCB y PCR y 30 ml con heparina para obtener leucocitos libres de glóbulos rojos después de la aplicación de un buffer de lisis

1.2.2 Frotis de Capa Blanca (FCB)

El FCB se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Carter *et al.* (1971), llenando dos tubos capilares por perro y centrifugando en una microcentrífuga (Clay Adams) a máxima velocidad durante 5 minutos. Posteriormente y mediante el uso de un lápiz de diamante se cortó la interfase y se separó la capa de glóbulos blancos y plaquetas, la cual se colocó en una lámina portaobjeto. Seguidamente se realizaron los extendidos, dejándose secar a temperatura ambiente y se fijaron con metanol. Luego se tiñeron con coloración rápida de Giemsa modificada (Hemacolor de Merck) y se dejaron secar a temperatura

ambiente para luego observarlo al microscopio de luz con objetivo de inmersión (100X), examinándose entre 400 y 500 campos microscópicos con la finalidad de observar la morfología de los leucocitos. La positividad se determinó mediante la visualización de inclusiones basófilas (mórulas Ehrlichiales) en el citoplasma de las células mononucleares.

1.2.3 Obtención de células mononucleares por gradiente de Ficoll/Hypaque (F/H)

De los 9 perros seleccionados con FCB positivo se escogieron tres para obtener células mononucleares mediante gradiente de F/H de acuerdo a la metodología descrita por Böyum (1968) con algunas modificaciones. Para esta técnica 6 ml de sangre heparinizada de cada uno de los tres animales se centrifugó a 170 x g durante 15 minutos, descartándose el plasma y reconstituyendo este volumen con buffer fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,2. La sangre reconstituida se añadió en un tubo cónico graduado que previamente contenía 3 ml de F/H. Luego de una centrifugación a 250 x g durante 45 minutos se recuperó la fracción de células mononucleares, la cual se colocó en un tubo cónico graduado con 10 ml de PBS para realizar tres lavados con PBS a 250 x g durante 10 minutos. En el último lavado el sedimento celular se resuspendió con 5 ml de MEM suplementado con SFB y esta suspensión se colocó en un frasco de cultivo de 25 cm² con células DH82 en fase estacionaria. El medio de cultivo se cambió al tercer día postinfección y luego dos veces semanales.

1.2.4 Obtención de leucocitos después de la aplicación de un buffer de lisis

De cada uno de los tres perros escogidos para realizar esta metodología se extrajeron 30 ml de sangre y se dividieron en alícuotas de 10 ml cada una para

proceder de acuerdo a lo descrito por Dawson *et al.* (1994) Obtenidos los leucocitos y después de realizar tres lavados al sedimento celular con PBS se resuspendió en 5 ml de MEM suplementado con SFB y esta suspensión se colocó en un frasco de cultivo de 25 cm² con células DH82 en fase estacionaria. El medio de cultivo se cambió al tercer día postinfección y luego dos veces semanales.

1.3 Aislamiento de Ehrlichia Monocítica Canina en cultivos primarios *in vitro* de monocitos sanguíneos obtenidos de un perro infectado experimentalmente

El microorganismo para realizar la infección experimental se obtuvo de un perro infectado naturalmente, mestizo, de año y medio de edad que asistió a la consulta del Hospital de Pequeños Animales "Dr. Daniel Cabello" de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV, Núcleo Maracay. Al animal se le extrajeron 10 ml de sangre con EDTA de los cuales con 5 ml se realizó hematología completa, FCB y una alícuota de 2 ml se guardó a -70 °C para realizar posteriormente la PCR. El resto de la sangre se conservó a 4 °C para utilizarla como inóculo a las 24 horas después de extraída.

Con el propósito de preparar cultivos primarios infectados, se inoculó con 5 ml de sangre infectada una perra de aproximadamente tres años de edad, mestiza, esplenectomizada con un año de anterioridad. Las condiciones de alimentación y las del ambiente donde se mantuvo el animal fueron similares a las descritas por Gutiérrez *et al.* (1999). La temperatura corporal de la perra se midió dos veces al día, 15 días antes y 70 días después de la inoculación utilizándose para ello un termómetro Sun ® Great KD-204A.

Para comprobar la infección del animal se extrajeron 10 ml de sangre, de los cuales se utilizaron 4ml con EDTA para realizar hemoglobina (Hb) y hematocrito

(Hto), recuento de leucocitos y plaquetas (Coulter electrónico Onix), velocidad de sedimentación globular (V.S.G.) en tubos de Wintrobe y FCB; estas determinaciones se realizaron a los días 0, 10, 14, 17, 19, 20, 21, 23, 25, 28, 44 y 70 postinoculación (PI). Se almacenaron a -70°C 2 ml de sangre con EDTA para la PCR, la cual se colectó a los días 0, 10, 14, 17, 19, 23, 32, 43, 50, y 73 PI. Se realizó serología los días 0 y 70 PI para lo cual se extrajeron aproximadamente 4 ml de sangre total. Para los cultivos primarios se obtuvieron 60 ml de sangre con heparina a los días 19, 21, 23 y 25 PI. El tratamiento se inició en el día 50 PI con doxiciclina a una dosis de 200 mg/día vía oral durante 14 días.

1.3.1 Cultivos primarios de monocitos

Con el objetivo de aislar Ehrlichia Monocítica Canina se realizaron dos tipos de cultivos primarios de monocitos:

1. Cultivos Primarios de monocitos no infectados
2. Cultivos Primarios de monocitos infectados

1.3.1.1 Cultivos Primarios de monocitos no infectados

Con la finalidad de utilizarlos como control negativo y para realizar los pases de los cultivos primarios de monocitos infectados, se establecieron cultivos primarios de monocitos no infectados de acuerdo a una metodología similar a la descrita por Hemelt *et al.* (1980). Se extrajeron 40 ml de sangre con heparina de una perra raza Pastor Alemán de dos años de edad, sana y seronegativa al Ag de *Ehrlichia canis*. La sangre se añadió a un cilindro que contenía 20 ml de Na_2SO_4 -Dextrano al 2,5 % en solución salina al 0,85 %. Después de mezclar suavemente la sangre permaneció en reposo a temperatura ambiente durante 45 minutos. Esta metodología se realizó con la

finalidad de aumentar la velocidad de sedimentación de los glóbulos rojos para obtener un plasma-Dextrano rico en leucocitos.

Después de extraído el plasma en un tubo cónico graduado de 50 ml se centrifugó a 250 x g durante 10 minutos y en aquellos donde se observaban glóbulos rojos, el sedimento celular se resuspendió en 5 ml de buffer de lisis (NH_4Cl 150 mM; KH_2PO_4 0,7 mM; EDTA- Na_2 3 mM) para eliminar los mismos. Luego de 5 minutos se añadió 30 ml de MEM base no suplementado y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se resuspendió en 30 ml de medio MEM suplementado con 1,2 % de glutamina (200 mM) (Hyclone), 15 % de SFB (Hyclone) o 15 % de suero canino inactivado y se añadieron volúmenes de 10 ml en frascos de cultivo de 25 cm^2 ; el medio se cambió dos veces a la semana.

1.3.1.2 Cultivos Primarios de monocitos infectados

Estos cultivos se establecieron de acuerdo a lo descrito por Nyindo *et al.* (1971) con ciertas modificaciones; en un cilindro graduado de 100 ml se colocaron 60 ml de sangre heparinizada de la perra inoculada experimentalmente y en fase aguda de la enfermedad cuando en el FCB se observaban mórulas intracitoplasmáticas en células mononucleares. La sangre de este animal sedimentaba espontáneamente después de una hora en reposo a temperatura ambiente debido a que generalmente en la etapa aguda de la Ehrlichiosis Canina la V.S.G. está aumentada. Transcurrido este tiempo se obtenía un plasma rico en leucocitos, el cual se añadió en frascos de cultivo de 25 cm^2 en volúmenes entre 8 a 10 ml.

Los frascos se incubaron a 37 °C sin atmósfera de CO_2 durante 48 horas; transcurrido este tiempo se descartó el sobrenadante y la superficie del recipiente de cultivo se lavó suavemente dos veces con MEM base sin suplementar y luego se

añadió 10 ml de MEM suplementado con 15 % de suero canino (6 cultivos) o 15 % de SFB (3 cultivos) inactivado. Los cambios del medio se realizaron dos veces por semana.

Después de 15 a 20 días del inicio de estos cultivos se realizaron pases a cultivos primarios no infectados previamente establecidos de los cuales hubo un cultivo que llegó al cuarto pase. Cuando se cambiaba el medio, el sobrenadante de los cultivos con SFB se añadía a la línea celular DH82 y cuando se realizaban los pases, hubo cultivos completos con SFB que también se pasaron a la línea DH82. Algunos cultivos infectados del segundo y tercer pase cuyo medio estaba suplementado con suero canino se centrifugaron a $3.180 \times g$ durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 5 ml de medio suplementado con SFB al 15 %, luego esta suspensión se añadió a cultivos celulares DH82 en fase estacionaria.

La determinación del porcentaje de monocitos infectados se evaluó por coloración de Giemsa modificada e Inmunofluorescencia Directa (IFD) y se guardaron muestras a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para realizar la PCR. De los cultivos del tercer pase se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ el contenido de un frasco de cultivo con 65 % de monocitos infectados cuyo medio estaba suplementado con suero canino (aproximadamente 5 ml) en un volumen igual de glicerol al 15 % en buffer fosfato salino (Na_2HPO_4 10 mM; KH_2PO_4 10 mM; NaCl 0,85 %) pH 7,4 para realizar posteriormente inoculación experimental en un perro sano.

1.4 Inoculación experimental de un perro sano utilizando como inóculo cultivos primarios de monocitos infectados

Para comprobar la infectividad de los cultivos primarios se procedió a inocular vía intravenosa a una perra raza Pastor Alemán de tres años de edad. Se

utilizó como inóculo 5 ml de cultivo primario del tercer pase con aproximadamente 65 % de monocitos infectados que habían estado almacenados a -70°C . Se evaluaron diariamente los signos clínicos y la temperatura corporal del animal se midió dos veces al día, desde 7 días antes de la inoculación hasta el día 48 PI. Con la finalidad de evaluar los cambios hematológicos se extrajeron 10 ml de sangre, de los cuales se utilizaron 4ml con EDTA para realizar Hb y Hto, recuento de leucocitos y plaquetas (Coulter electrónico Onix), V.S.G. y FCB; estas determinaciones se realizaron a los días 0, 6, 9, 14, 16, 18, 29 y 64 PI. Se almacenaron a -70°C 2 ml de sangre para la PCR a los días 0, 6, 14, 18, 21, 25, 46 y 64 PI; para la serología se almacenaron 2 ml de suero a -20°C , cuyas muestras se extrajeron a los días 0, 6, 9, 14, 18, 21, 25, 46 y 64 PI. El tratamiento con doxiciclina comenzó en el día 24 PI (200 mg/día) y se mantuvo durante 14 días.

2. Detección de Ehrlichia Monocítica Canina en los cultivos *in vitro* por coloración de Giemsa e Inmunofluorescencia Directa (IFD)

Tanto los cultivos *in vitro* de células DH82 inoculados directamente con células mononucleares infectadas obtenidas por gradiente con F/H o con leucocitos libres de glóbulos rojos como los cultivos primarios *in vitro*, comenzaron a examinarse a partir del tercer día postinfección, dos veces a la semana hasta el día 60 postinoculación. Con la finalidad de calcular el porcentaje de células infectadas entre el total de células desprendidas en el sobrenadante del medio de cultivo, cada vez que se cambiaba el medio se añadía 0,5 ml en viales cilíndricos de base plana de 12 mm de diámetro en cuyo interior se encontraba una laminilla de 64 mm^2 . Posteriormente se centrifugó a $110 \times g$ durante 10 minutos para que las células se adhirieran a la laminilla. Luego se extraían las laminillas del vial y se dejaban secar a temperatura ambiente. Una laminilla se fijó con metanol para colorearla con Giemsa modificada y otra se destinó para realizar Inmunofluorescencia Directa (IFD).

Una vez seca la laminilla que se iba a evaluar con IFD se fijó con acetona durante 10 minutos y se esperó una hora hasta añadir el conjugado anti-*Ehrlichia* Monocítica Canina preparado en el laboratorio (Anexo A). El conjugado se utilizó a una dilución 1/40 (previa estandarización de la dilución de trabajo) en Azul de Evans diluido 1/10 en buffer fosfato salino (PBS) (Na_2HPO_4 57 mM; K_2HPO_4 18 mM; NaCl 0,44 %) pH 7,2. Después de un período de incubación de 35 minutos a 37 °C en cámara húmeda se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno, dos lavados con el buffer mencionado anteriormente y uno con agua destilada. Se esperó a que se secase la laminilla a temperatura ambiente y seguidamente se añadió una gota de una solución tamponada de glicerina (9 partes de glicerina y 1 parte de PBS). Las laminillas se examinaron en un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss) usando una fuente de luz ultravioleta. Simultáneamente se ensayaron por IFD laminillas con células DH82 no infectadas como controles negativos.

3. Identificación ultraestructural de *Ehrlichia* sp. a través de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Para comprobar que las inclusiones basófilas observadas correspondían a bacterias del género *Ehrlichia*, de los nueve perros seleccionados anteriormente se escogieron tres muestras sanguíneas para realizar MET. Se dejó sedimentar espontáneamente 10 ml de sangre con EDTA a temperatura ambiente durante una hora para obtener el plasma rico en leucocitos. Este plasma se transfirió a un tubo cónico graduado de vidrio, el cual se centrifugó a 250 x g durante 10 minutos. Se descartó el plasma. El sedimento celular se fijó en glutaraldehído al 2 % en buffer fosfato 0,2 M (PB), luego se postfijó con tetraóxido de osmio al 1 % en PB, seguidamente se deshidrató en concentraciones crecientes de etanol (50 %, 75 %, 95 % y 100 %) y se infiltró e incluyó en plástico (Embed-812; Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA 19034, USA), utilizando el óxido de propileno como solvente intermedio. De los bloques se cortaron secciones finas (60-80 nm) con un

ultramicrotomo Porter Blum Sorvall MT2, los cuales se recogieron en rejillas de 200 mesh y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras fueron observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico de transmisión Phillips EM 208 a 60 kV.

4. Identificación de *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

4.1 Extracción de ADN a partir de muestras sanguíneas y cultivos

Las muestras de sangre y los cultivos de *E. canis* y *E. chaffeensis* fueron almacenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para extraer el ADN se procedió de acuerdo a lo descrito por Tzianabos *et al.*(1989) con algunas modificaciones. En cada caso, una muestra de 250 μl (de sangre o cultivo) fue descongelada y transferida a un tubo para microcentrífuga de 1,5 ml; se adicionaron 80 μl de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 6 % y 25 μl de proteinasa K (1mg/ml) (Promega), para finalmente mezclar e incubar a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora con agitación ocasional. Culminada la incubación con proteinasa K se realizó una extracción con un volumen igual (350 μl) de fenol equilibrado con buffer Tris-HCl 100 mM, pH 8 y seguidamente con un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1 (Anexo B). Luego se calculó el volumen de la fase acuosa de la última extracción y se precipitó el ADN, añadiendo acetato de sodio 3 M, pH 5,25 (1/10 del volumen de la fase acuosa recuperada), y etanol absoluto frío (2,5 volúmenes). Se dejó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos y se centrifugó a $15.000 \times g$ durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento de ADN fue lavado dos veces con etanol al 70%, centrifugando a la misma velocidad por 5 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se agregó etanol al 100 %, se centrifugó en las mismas condiciones anteriores y el sedimento (seco) se resuspendió en 50 μl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM EDTA 1 mM, pH 8).

Se determinó la concentración y pureza del ADN midiendo la absorbancia tanto a 260 nm como a 280 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU 650). Para determinar la calidad del ADN se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 1 % en buffer TBE (Tris 90 mM; H₂BO₃ 90 mM; EDTA 2mM, pH 8) teñido con bromuro de etidio (Anexo C). El patrón electroforético fue visualizado por transiluminación UV en un equipo Gel Doc 1000 (Bio-Rad).

4.2 Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada para el diagnóstico de *E. canis* y *E. chaffeensis*

Para poder realizar la identificación de las Ehrlichias Monocíticas fue necesario estandarizar la PCR anidada, utilizando en una primera ronda (PCR de género) el par de oligonucleótidos sintéticos (Operon technologies, inc.):

ECC (5'-AGAACGAACGCTGGCGGCCAAGC-3'), y

ECB (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA3') (Dawson *et al.*, 1994), los cuales amplifican una región del gen ARNr 16S de la mayoría de las especies de *Ehrlichia* y bacterias como por ejemplo: *Rickettsia rickettsii*, *Anaplasma marginale*, *Escherichia coli*, entre otras. La metodología empleada fue de acuerdo a lo descrito por Wen *et al.*, (1997) con algunas modificaciones. La reacción se realizó en un volumen final de 50 µl de mezcla, la cual contenía 5 µl de buffer para PCR 10 X, 10 µl de MgCl₂ 25 mM, 4 µl de la mezcla de desoxinucleósidos trifosfato 2,5 mM, 2 pmoles de los oligonucleótidos y 1,25 U de *Taq* polimerasa (Promega) en buffer B (Tris-HCl, 20 mM, pH 8; KCl 100 mM; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM; Glicerol 50 %; Nonidet P-40 0,5 % y Tween 20 0,5 %).

Para las amplificaciones se utilizó el siguiente esquema de temperaturas y tiempos, programado en un termociclador PTC-200 (Research MJ): 94 °C durante 4 minutos, luego 40 ciclos de 94 °C durante un minuto para la desnaturalización del ADN, 60 °C durante un minuto para la hibridación de los oligonucleótidos y 72 °C

durante un minuto para la extensión de las cadenas de ADN. Tomando en cuenta los resultados obtenidos con la temperatura de hibridación de 60 °C, se realizaron ensayos variando la temperatura de hibridación a 65 °C, 66 °C, 67 °C y 68 °C.

Para la estandarización se utilizó ADN extraído de un cultivo de células DH82 (macrófagos caninos) infectado con *E. chaffeensis*, gentilmente cedido por la Dra. Jacqueline Dawson del CDC de Atlanta (Estados Unidos). El ADN de *E. canis* fue obtenido a partir de la línea celular DH82, expandida e infectada de acuerdo al método descrito en comunicación personal por la Dra. Dawson (anexoD). El vial de *E. canis* también fue gentilmente cedido por la Dra. Dawson. El ADN extraído de los cultivos infectados es una mezcla de ADN de los macrófagos caninos y ADN de la Ehrlichia, por lo tanto es imposible determinar la concentración verdadera del ADN Ehrlichial. Por esta razón, los ensayos iniciales se realizaron con 1 µl y 10 µl de ADN de estos cultivos. Una vez estandarizada la PCR, el ADN extraído de las muestras sanguíneas se probaron a estos dos volúmenes. Esto se hace debido a que los organismos Ehrlichiales son intracelulares obligatorios y es difícil estimar la concentración verdadera del ADN bacterial. El ADN de la muestra es una mezcla de ADN de la célula hospedadora y ADN de la Ehrlichia; este último puede estar en muy altas o en muy bajas concentraciones y estas dos situaciones pueden producir resultados falsos negativos. Debido a que los cebadores de género (ECC/ECB) amplifican el ADN de otras bacterias, entre ellas *Escherichia coli*, se incluyó el ADN de esta bacteria en la estandarización; se utilizaron 20 y 200 ng contenidos en volúmenes de 1 µl y 10 µl respectivamente. Como control negativo se utilizaron 100 ng de ADN extraído de células DH82 no infectadas (en un volumen de 10 µl) y como control de reactivos 10 µl agua en lugar de ADN.

Para la estandarización de la segunda PCR se ensayaron volúmenes de 1, 2 y 5 µl del producto de la PCR anterior, los cuales servirían como plantilla de ADN para la segunda, y los oligonucleótidos para la especie *E. canis*:

ECA (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3'), y

HE3 (5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3') (Anderson *et al.*, 1992b).

Para la especie *E. chaffeensis* se utilizaron las mismas cantidades de producto descritas anteriormente y los oligonucleótidos para la especie *E. chaffeensis*:

HE1 (5'-CAATTGCTTATAACCTTTTGGTTATAAAT-3'), y

HE3 (5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3') (Anderson *et al.*, 1992b).

La concentración de los reactivos utilizados en la mezcla de PCR y la metodología empleada fue semejante a la descrita en la primera PCR pero se ensayó una sola temperatura de hibridación de 60 °C.

Para analizar los productos formados tanto en la primera como en la segunda PCR, se mezclaron 10 µl de cada una de las mezclas de amplificación, 3 µl de buffer 5X para muestras de ADN (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; SDS 1 %; Glicerol 80 %, 0,01% azul de bromofenol; 0,01% azul de xilencianol) y 2 µl de agua para un volumen final de 15 µl. Se colocaron 12 µl de esta mezcla en cada uno de los canales de un gel de agarosa al 1,2 % teñido con bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó a un voltaje constante de 60 Voltios (debe determinar 60 mA inicialmente) durante 1 hora. Se incluyó una muestra con patrones de peso molecular (Marcador de 100 pb o 1 Kb, Promega). El patrón electroforético fue visualizado por transiluminación UV y analizado como se indicó en la Sección 4.1.

4.3 Análisis de secuencias y estimación de condiciones óptimas para la hibridación

Antes de realizar la estandarización se comprobó la hibridación de los cebadores con el ADN de las bacterias a utilizarse en la PCR, se obtuvo la secuencia parcial del gen ARNr 16S de *E. canis* (cepa de Oklahoma, número de acceso M73221) y *E. chaffeensis* (cepa de Arkansas, número de acceso M73222) depositadas en el Banco de genes, a través del servicio PUBMED.

Una vez obtenidas las secuencias, se realizó el análisis de hibridación entre los cebadores ECC/ECB y los genes de *E. canis* y *E. chaffeensis* usando el programa Gene Runner (versión 3.00 de Hastings Software, Inc., 1994). El cebador ECC hibridiza desde la posición 4 hasta la 25 de la secuencia en el gen de ambas bacterias y el cebador ECB entre las posiciones 460 y 481 para *E. canis* y 462 a la 482 para *E. chaffeensis*. Como en la prueba se utilizaría ADN de *E. coli* como control, se accedió a la secuencia completa del gen ARNr 16S (número de acceso JO1695). Este mismo análisis se realizó con los cebadores ECA/HE3 específicos para la especie *E. canis* y HE1/HE3 para *E. chaffeensis*.

Analizando las características físico-químicas del cebador ECA en el programa Gene Runner se observó que tiende a formar estructuras secundarias estables del tipo horquilla con bucle, las dos más estables se muestran a continuación:



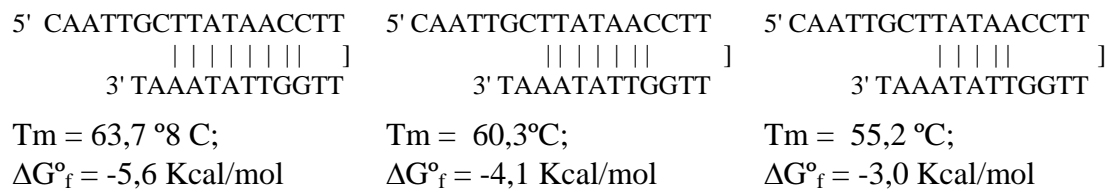
$$T_m = 53,7 \text{ } ^\circ\text{C}; \quad \Delta G^\circ_f = -3,7 \text{ Kcal/mol}$$



$$T_m = 60,3 \text{ } ^\circ\text{C}; \quad \Delta G^\circ_f = -3,6 \text{ Kcal/mol}$$

Como se puede observar, ambas estructuras tienen un cambio de energía libre de formación bastante favorable (-3,7 y -3,6 Kcal/mol, respectivamente) y temperaturas de fusión que prácticamente aseguran que una porción importante del

cebador se encuentre estructurado. Es particularmente importante la estructura con temperatura de fusión de 60,3 °C pues el ciclo reportado para la PCR tiene 60°C como temperatura de hibridación. Por lo tanto, se puede predecir que aproximadamente un 50% del cebador estará inhabilitado para hibridar. Para evitar esta limitación se decidió ensayar la PCR calentando el cebador a 80 °C durante dos minutos antes de añadirlo a la mezcla de reacción. El cebador HE1 también tiende a formar las mismas estructuras secundarias estables mencionadas anteriormente, siendo las tres más estables las que se señalan a continuación:



Realizando el mismo análisis que se hizo con el cebador ECA se procedió a ensayar la PCR con el mismo criterio.

IV. RESULTADOS

1. Aislamiento de Ehrlichia Monocítica Canina a partir de perros infectados natural y experimentalmente

1.1 Establecimiento de la línea celular continua DH82

La línea celular DH82 se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC CRL-10389), por lo tanto para conocer sus características de crecimiento y establecer el cultivo en el laboratorio se procedió a realizar una curva de crecimiento realizando contajes celulares y porcentajes de viabilidad por triplicado el día en que se sembraron los frascos de cultivo (día 0) y luego desde el tercer hasta el décimo día después de sembrado para finalmente realizar un contaje al decimocuarto día.

Los resultados promediados de los recuentos celulares y porcentajes de viabilidad celular se graficaron tomando en cuenta el total de células por frasco de cultivo y su respectivo porcentaje de viabilidad vs. días del cultivo. Como se observa en la Figura 4, la fase logarítmica estuvo comprendida entre el cuarto y sexto día de iniciado el cultivo, observándose al microscopio invertido que las células ocupaban aproximadamente entre el 85% y 95 % de la superficie del frasco de cultivo, formando una monocapa celular. La fase estacionaria se alcanzó entre los días séptimo y octavo y una de sus características fue la observación al microscopio invertido de grupos celulares semejantes a racimos celulares que sobresalían de la superficie de la monocapa celular; finalmente el número total de células empezó a declinar al noveno día. El tiempo de duplicación de la población celular se observó al sexto día y el máximo valor de células totales fue de $6,8 \times 10^6$. El porcentaje de viabilidad se

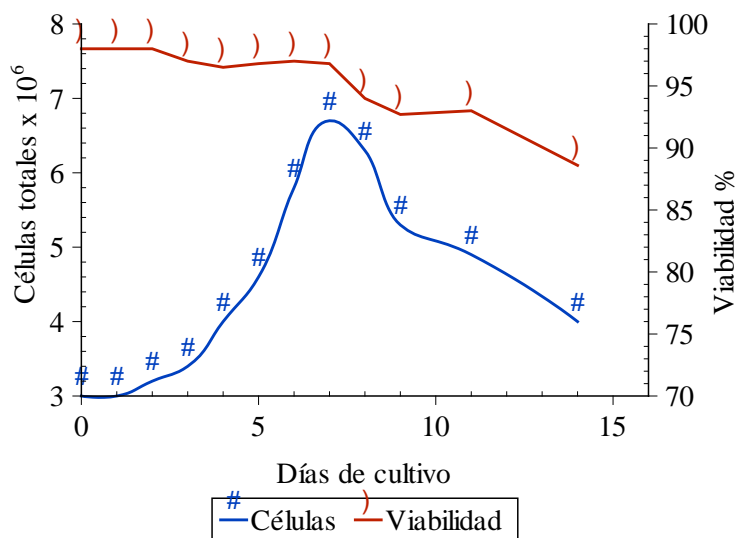


Figura 4. Curva de crecimiento de la línea celular DH82

mantuvo estable durante cada una de las fases de la curva entre el 96 % y 97 % y se observó un leve descenso después del noveno día de cultivo.

La línea celular no se adaptó al medio de cultivo cuando el medio se suplementó con suero canino. Las características del cultivo que nos permitieron hacer esta afirmación fueron: el abundante desprendimiento celular observado y la disminución de la viabilidad hasta en un 65% cuando los cultivos tenían tres días de sembrados, por lo tanto se decidió seguir los cultivos con medio suplementado con suero fetal bovino.

Con respecto a la crioconservación de las células, se observó que con las condiciones recomendadas por la ATCC (5×10^6 células/ml en medio conservador A) a los tres meses de descongeladas las células, la viabilidad estaba comprendida entre el 60% y el 70 %, por lo tanto se decidió ensayar la concentración celular $2,5 \times 10^6$ células/ml y además los medios conservadores B y C. De las diferentes pruebas que se realizaron con cada una de las concentraciones celulares y cada uno de los medios de

conservación se observó que la concentración celular y medio conservador que resultó con porcentajes de viabilidad mayores o iguales al 90 % cuando se descongelaban células que tenían hasta seis meses de congeladas fue la concentración celular $2,5 \times 10^6$ células/ml y el medio conservador C, el cual estaba constituido por 5 % DMSO, 45 % SFB y 50 % de MEM base.

1.2 Aislamiento de Ehrlichia Monocítica Canina directamente en la línea celular continua DH82 cultivada *in vitro*

1.2.1 Frotis de Capa Blanca (FCB) y Hematología

En los FCB de los nueve perros escogidos se observaron mórulas basófilas intracitoplasmáticas características en células mononucleares sugestivas de Ehrlichia Monocítica Canina (Figura 5).

En el cuadro N° 1 se presentan los resultados de la hematología y recuento de plaquetas de los nueve perros seleccionados. Se puede observar que de acuerdo a los valores referenciales de los parámetros hematológicos en los perros, (Anexo E) los nueve animales presentaron trombocitopenia y anemia (100 %) y dos tenían además leucopenia (22,2 %). Con respecto a los valores absolutos del diferencial de leucocitos se pudo evidenciar un perro con neutropenia (11,1 %), uno con linfopenia (11,1 %), uno con linfocitosis (11,1 %) y dos con monocitosis (22,2 %).

A partir de las muestras de sangre de los 9 perros infectados naturalmente se obtuvieron células mononucleares mediante gradiente de Ficoll- Hypaque o leucocitos libres de glóbulos rojos, como se explica en la sección de Materiales y Métodos. En ambos casos las células resultantes se inocularon directamente en frascos de cultivo con células DH82 en fase estacionaria. A pesar de que se logró establecer el cultivo de las células DH82, los intentos de aislamiento de los organismos Ehrlichiales a partir de las células de los perros infectados naturalmente fueron infructuosos, ya que las células desprendidas de los cultivos estaban negativas por Inmunofluorescencia

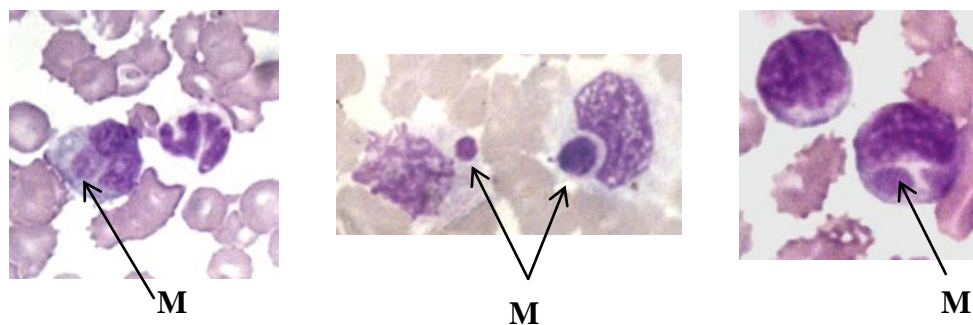


Figura 5. Frotis de Capa Blanca donde se observan las inclusiones intracitoplasmáticas basófilas correspondientes a las mórulas (M) en células mononucleares. Coloración de Giemsa. 1000X

CUADRO N°1

Datos hematológicos de los perros seleccionados para el aislamiento de *Ehrlichia Monocítica Canina*

Perro N°	Hb gr/dl	Hto %	Pqtas $\times 10^3$ ‡	Leu $\times 10^3$ §	Neu % (*)	Lin % (*)	Mon % (*)	Eos % (*)	Ban % (*)
1	5,8	17	38	10,3	58(5974)	32(3296)	10(1030)		
2	10,5	31	29	8,4	71(5964)	22(1848)	7 (588)		
3	9,0	27	21	6,3	57(3591)	19(1197)	23(1449)	1 (63)	
4	7,7	25	14	9,2	54(4968)	35(3220)	11(1012)		
5	7,8	23	71	15,1	35(5285)	48(7248)	12(1812)	3 (453)	2 (302)
6	8,8	27	125	6,8	66(4488)	14 (952)	8 (544)	12 (816)	
7	8,9	25	28	5,6	64(3584)	13 (728)	23(1288)		
8	10	27	15	3,9	52(2028)	39(1521)	6 (234)	3 (117)	
9	9,6	26	113	9,8	51(4998)	20(1960)	20(1960)	8 (784)	1 (98)

Hb: Hemoglobina; Hto: Hematocrito; ‡: Plaquetas/ μ l; §: Leucocitos/ μ l; ; (*) Número de células/ μ l;

Neu: Neutrófilos; Ban: Bandas; Lin: Linfocitos; Mon: Monocitos; Eos: Eosinófilos

Directa, aún a los 60 días después de haber sido inoculada la línea celular, por lo que se decidió realizar cultivos primarios de monocitos de un perro infectado experimentalmente y estos cultivos primarios adaptarlos en la línea celular DH82.

1.2.2 Selección mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) tanto de sueros negativos como de sueros con un título alto de Acs necesarios para preparar el conjugado para la IFD

Para preparar el conjugado para la IFD se requería de un suero con un título alto de Acs, por lo tanto se realizó un estudio serológico por IFI de 13 perros con la finalidad de encontrar este suero. Además este estudio también se utilizó para seleccionar sueros negativos a ser usados como controles en las pruebas futuras.

Previamente a la aplicación de la IFI en las muestras problemas, se probaron las diluciones 1/10, 1/20, 1/40 y 1/80 del suero control negativo y positivo con Ag de *E. canis*. Después de realizadas las pruebas, se determinó que la mejor dilución era 1/40, ya que a diluciones inferiores a ésta, tanto en el control negativo como en el positivo se observaron células con fluorescencia inespecífica. La reacción fue considerada positiva cuando se visualizaron mórulas fluorescentes intracitoplasmáticas de 4 a 5 μm de diámetro (Figura 6 A), mientras que la reacción se consideró negativa si se evidenciaban células sin inclusiones fluorescentes (Figura 6 B).

Para el momento de la extracción sanguínea de los perros con los que se realizó el estudio serológico se pudo evidenciar que estaban en buenas condiciones físicas y sanitarias, sin embargo los dueños refirieron infestaciones frecuentes con

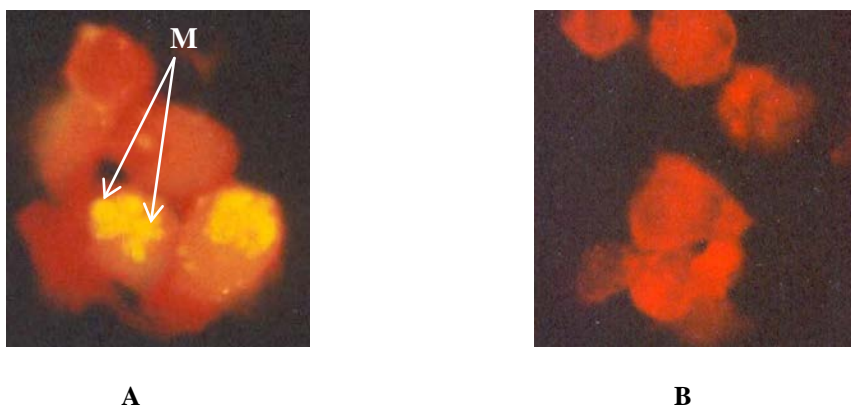


Figura 6. Inmunofluorescencia Indirecta. Figura 6 A. Mórulas (M) fluorescentes del control positivo. 400X. Figura 6 B. Células sin inclusiones fluorescentes del control negativo. 400X.

garrapatas, a excepción de dos de ellos que manifestaron que a sus perros hasta ese momento no les habían observado garrapatas. En el cuadro N° 2 se puede observar que de los 13 perros evaluados por IFI, el 84,6 % (11/13), tenían Acs que reconocían al Ag de *E. canis* y el 15,4 % (2/13) resultaron negativos. Para la preparación del conjugado se consideraron sueros con un alto título de Acs aquellos que tuvieran un título \geq a 1/1280. Como se puede observar en el cuadro N° 3, el 27,3 % de los perros positivos (3/11) cumplían este requisito, por lo que se escogió el suero con el título de 1/2560 para preparar el conjugado.

CUADRO N° 2

SEROLOGÍA REALIZADA CON Ag *Ehrlichia canis* (CEPA DE FLORIDA) MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

PRUEBA CUALITATIVA	n	%
POSITIVO	11	84,6
NAGATIVO	2	15,4
TOTAL	13	100

CUADRO N° 3

DISTRIBUCIÓN DE LOS 11 SUEROS CANINOS POSITIVOS DE ACUERDO AL TÍTULO DE Acs DETERMINADO POR IFI

TÍTULO	n	%
1/40	0	0
1/80	1	9,0
1/160	3	27,4
1/320	2	18,2
1/640	2	18,2
1/1280	2	18,2
1/2560	1	9,0
TOTAL	11	100

Después que se preparó el conjugado anti-Ehrlichia Monocítica Canina se procedió a determinar la dilución de trabajo, definiéndose como la mínima dilución del conjugado en la que se empieza a evidenciar la reacción positiva. Se ensayaron las diluciones 1/10, 1/20, 1/40 y 1/80 con Ag de *E. canis* y se determinó que la dilución de trabajo del conjugado era 1/40.

1.3 Aislamiento de Ehrlichia Monocítica Canina en cultivos primarios *in vitro* de monocitos sanguíneos obtenidos de un perro infectado experimentalmente

El inóculo utilizado para reproducir la infección en un perro sano se obtuvo a partir de un animal infectado naturalmente que presentó fiebre (40,5 °C), pérdida del apetito y hepatoesplenomegalia. Entre los datos de laboratorio presentó 6.700

leucocitos/ μl , 16.000 plaquetas/ μl , hemoglobina (Hb) y hematocrito (Hto) de 1,9 gr/dl y 6,3 % respectivamente. El diferencial de los leucocitos estuvo conformado por 69 % de neutrófilos (4.623/ μl), 7 % de neutrófilos en banda (469/ μl), 3 % de linfocitos (201/ μl) y 21 % de monocitos (1.407/ μl). En el FCB de este animal se observaron mórulas Ehrlichiales características en células mononucleares.

1.3.1 Características clínicas, hematológicas y FCB del perro inoculado experimentalmente

La perra utilizada para la inoculación experimental estaba esplenectomizada (un año antes) para el momento de la administración del inóculo. Antes de la esplenectomía el animal presentaba los siguientes valores hematológicos: 13.200 leucocitos/ μl con 76 % de neutrófilos (10.032/ μl), 21 % de linfocitos (2.772/ μl), 2% de eosinófilos (264/ μl) y 1 % de monocitos (132/ μl), 150.000 plaquetas/ μl , Hb de 13,2 gr/dl y Hto de 42 %. Para el momento de la inoculación la perra no presentaba signos clínicos de Ehrlichiosis Canina y debido a la esplenectomía se evidenciaba leucocitosis (21.100/ μl) y trombocitosis (683.000/ μl); los valores de Hb (12,4 gr/dl) y Hto (37 %) estaban dentro de los valores referenciales. En el FCB no se observaban inclusiones intracitoplasmáticas semejantes a Ehrlichia Monocítica Canina y por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) utilizando Ag de *E. canis*, tenía un título de Acs de 1/640.

En los extendidos sanguíneos de la perra inoculada, se observaron cuerpos iniciales y mórulas difusas a los días 14 y 17 postinoculación (PI) respectivamente; a partir del día 18 hasta el día 21 se visualizaron mórulas compactas. El animal mostró signos clínicos de Ehrlichiosis Canina el día 15 PI, manifestándose inicialmente con pérdida del apetito y decaimiento. Con relación a la temperatura corporal (Figura 7), antes de la administración del inóculo el promedio fue de 38,5 °C con un mínimo de 37,8 °C y un máximo de 39 °C, no observándose picos febriles (Valores referenciales:

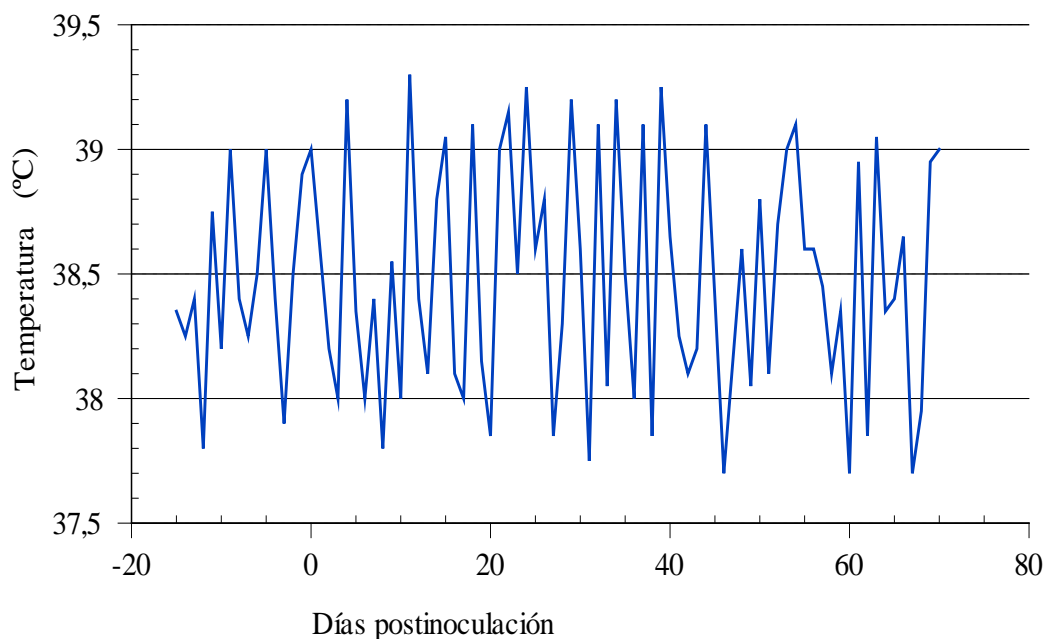


Figura 7. Temperatura rectal observada 15 días antes y después de la inoculación experimental.

37,5-39 °C); después de la administración del inóculo y antes del tratamiento (día 50 PI) el promedio de la temperatura corporal fue de 38,5 °C con un mínimo de 37,8 °C y un máximo de 39,3 °C. Los ligeros aumentos de temperatura se observaron a los días 4, 11 y 15 PI.

Después de la inoculación se observa un descenso en los valores hematológicos. El primer parámetro que disminuye por debajo de los valores normales es la Hb y el Hto (Figura 8), el cual se observó al décimo día PI. El valor mínimo observado fue de 8,6 g/dl en el día 25 PI. La disminución de los leucocitos y las plaquetas se hizo progresivo a partir del día 17 PI, pero en ningún momento hubo leucopenia. Entre los días 19, 20 y 21 PI los recuentos plaquetarios estuvieron por debajo de los valores referenciales, los cuales llegaron a 106.000/ μ l, 121.000/ μ l y

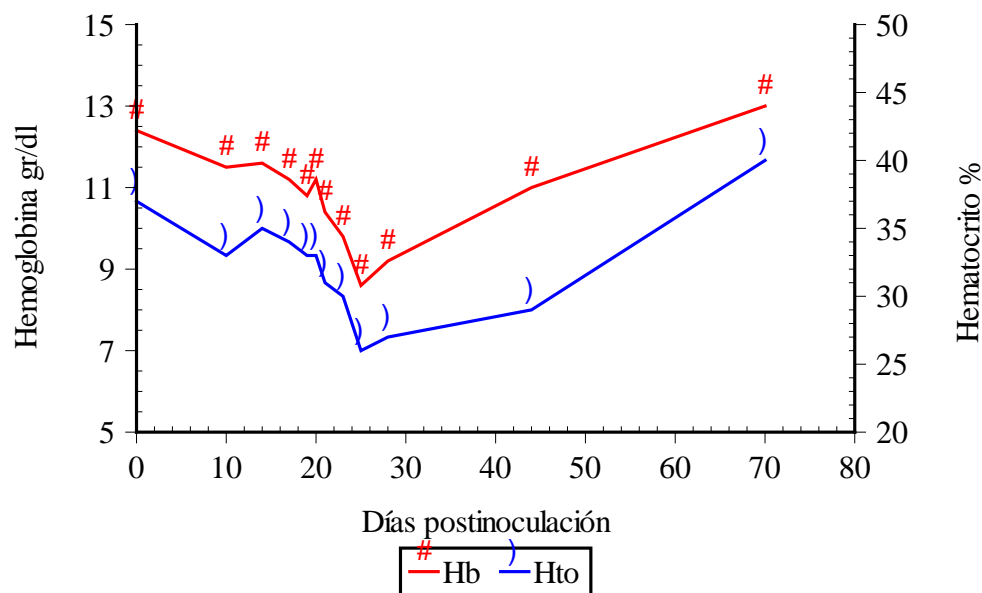


Figura 8. Hemoglobina y Hematocrito después de la inoculación experimental

128.000/ μ l respectivamente (Figura 9). Para el día 23 PI el conteaje de plaquetas aumenta a valores normales sin administración de tratamiento al animal; el recuento de leucocitos ascendió progresivamente a partir del día 28 PI y para este mismo día la Hb y el Hto también comenzaron a ascender.

La V.S.G. comenzó a aumentar a partir del día 19 PI con valores máximos a los días 21, 23 y 25 PI correspondientes a 50 mm/hora, 56 mm/hora y 60 mm/hora respectivamente (Figura 10). En estos días, cuando la V.S.G. alcanzó sus valores máximos, se extrajo sangre para proceder a realizar los cultivos primarios; este parámetro empezó a disminuir a partir del día 28 PI. La perra recuperó el apetito sin tratamiento el día 29 PI mejorando aparentemente su condición clínica; se realizó una determinación hematológica el día 44 PI registrándose leucocitosis (19.300/ μ l) y trombocitosis (800.000/ μ l) como al inicio de la inoculación pero la V.S.G. todavía se encontraba acelerada (20 mm/hora), y la Hb y el Hto seguían por debajo de los valores referenciales; a los 20 días de iniciado el tratamiento (día 70 PI) se repiten los

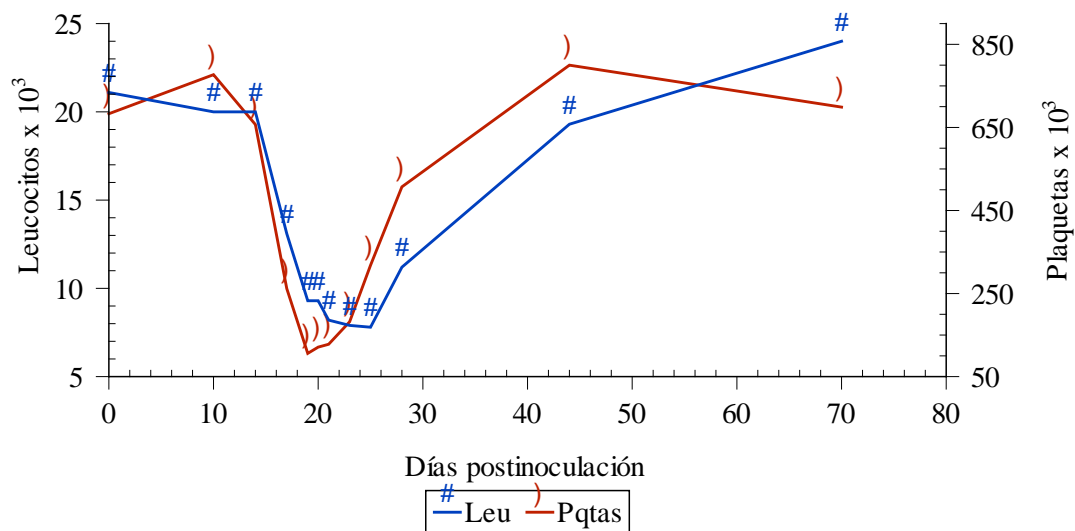


Figura 9. Leucocitos y Plaquetas después de la inoculación experimental

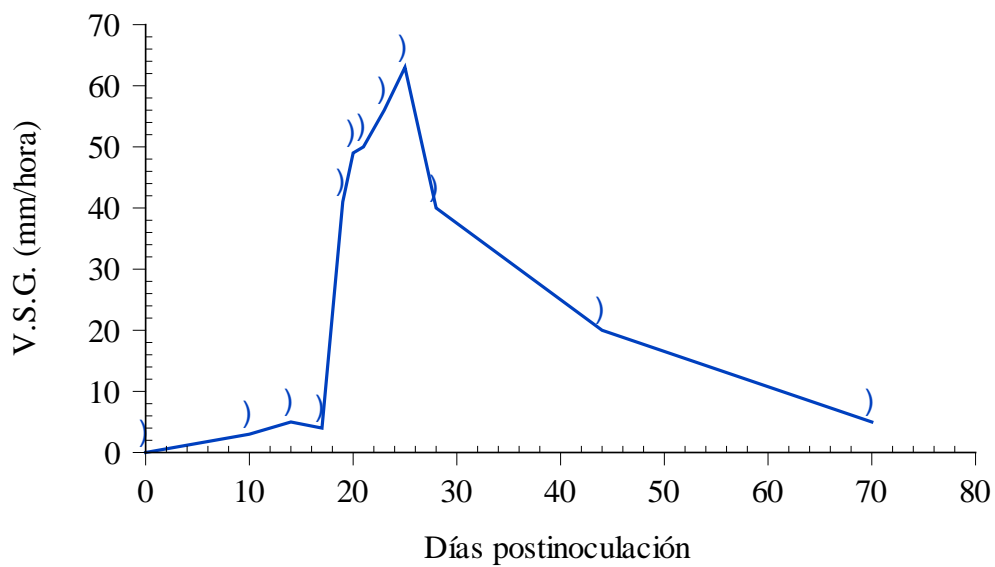


Figura 10. Velocidad de sedimentación globular (V.S.G) después de la inoculación experimental

exámenes hematológicos y los valores son semejantes a los iniciales. Para este momento se repite la serología y el título de Acs anti-*E. canis* resultó en 1/320.

1.3.2 Cultivos Primarios de monocitos *in vitro*

Se procedió a mantener dos tipos de cultivo *in vitro* de monocitos: infectados y no infectados, observándose en ambos cultivos que los monocitos se adhirieron a la superficie del frasco de cultivo aproximadamente a las 2 horas de sembrados. En los cultivos no infectados a las 48 horas, cuando se descartó el medio de cultivo con las células no adherentes (linfocitos y neutrófilos), se observaba una monocapa con monocitos de tamaño variable y con poca refringencia; a los 5 días después de sembrados, cuando se realizaba el siguiente cambio del medio los monocitos se mostraban refringentes y de tamaño uniforme.

En los cultivos primarios infectados, a las 48 horas de incubación y luego de eliminar el plasma con las células no adherentes, los monocitos adheridos transmitían poca refringencia, no se apreciaba bien el límite del citoplasma celular y en líneas generales tenían el aspecto de células dañadas. A las 24 horas de haber añadido el medio de cultivo suplementado con suero canino o bovino, los monocitos tenían mejor aspecto, emitían más refringencia y aparentemente aumentaban de tamaño. A las 72 horas después de realizado el primer cambio de medio, las células formaban una monocapa distribuida uniformemente y las células tenían un aspecto normal.

En los cultivos primarios infectados, cuyo medio de cultivo estaba suplementado con suero canino, se observaron al noveno día de sembrados inclusiones intracitoplasmáticas basófilas identificadas como cuerpos iniciales con un tamaño entre 1 a 2 μm y mórulas de 3 a 5 μm , con un predominio de los primeros (Figura 11).

Estos cultivos fueron analizados por Inmunofluorescencia Directa (IFD) y se

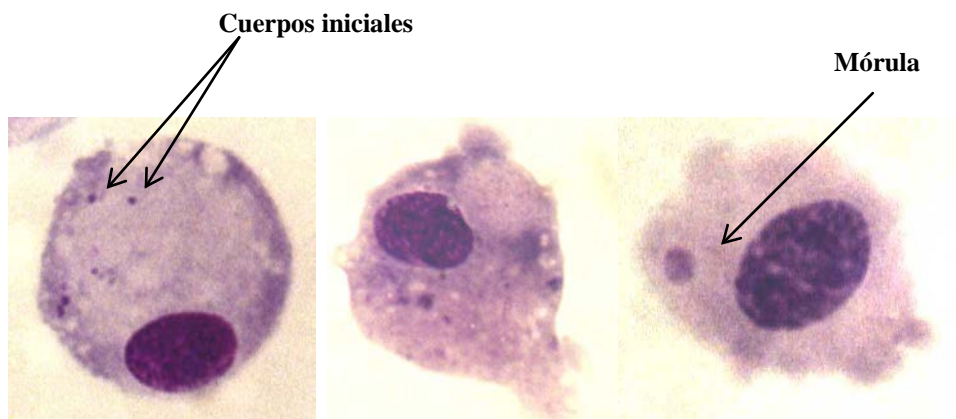


Figura 11. Cultivos Primarios infectados después del noveno día de cultivo *in vitro*. Coloración Giemsa 1000X

evidenciaron células con una sola inclusión fluorescente pequeña de aproximadamente $2\ \mu\text{m}$ (cuerpo inicial) y con dos inclusiones fluorescentes de aproximadamente $2\ \mu\text{m}$ y $4\ \mu\text{m}$, las cuales corresponden al cuerpo inicial y a la mórula respectivamente (Figura 12 A y 12 B). En otras células había una mezcla de cuerpos elementales, cuerpos iniciales y mórulas de aproximadamente $0,8\ \mu\text{m}$, $2\ \mu\text{m}$ y $3\ \mu\text{m}$ respectivamente (Figura 12 C). El porcentaje de monocitos infectados varió entre 7 % y 19 % en diferentes frascos.

A medida que transcurrió el tiempo de incubación del cultivo, aumentó el porcentaje de monocitos infectados, alcanzando un máximo de 35 % al día 15 de sembrado (Figura 13), visualizándose así mismo un mayor número de mórulas por célula. Al final del segundo y tercer pase algunas células se observaron con más de 60 mórulas (Figura 14), algunas en proceso de destrucción (Figura 15 A) y restos de citoplasmas con inclusiones; en ocasiones se observó división del núcleo celular (Figura 15 B).

Los cultivos primarios infectados, cuyo medio de cultivo estaba suplementado con suero bovino, se comportaron de manera semejante a la descrita anteriormente a

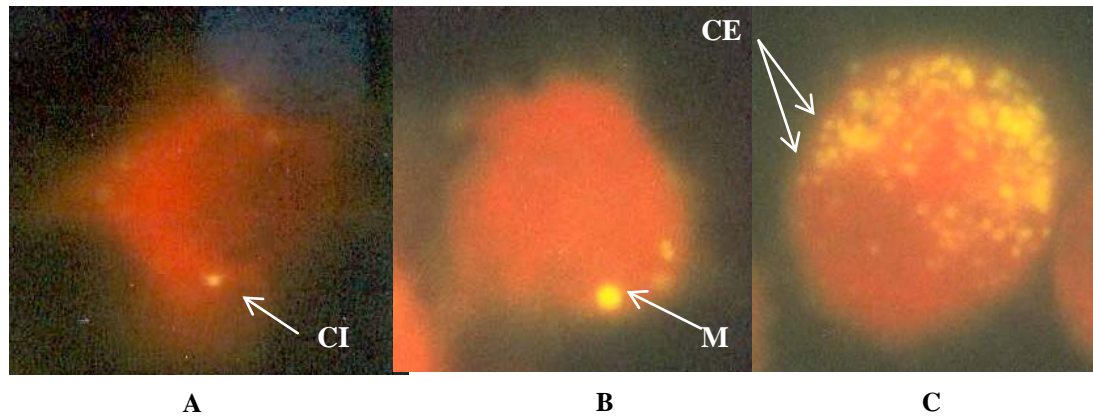


Figura 12. Cultivos Primarios infectados después del noveno día de cultivo *in vitro*. Inmunofluorescencia Directa. Figura 12 A. Cuerpo Inicial (CI). Figura 12 B. Mórula (M). Figura 12 C. Cuerpos Elementales (CE). 1000X

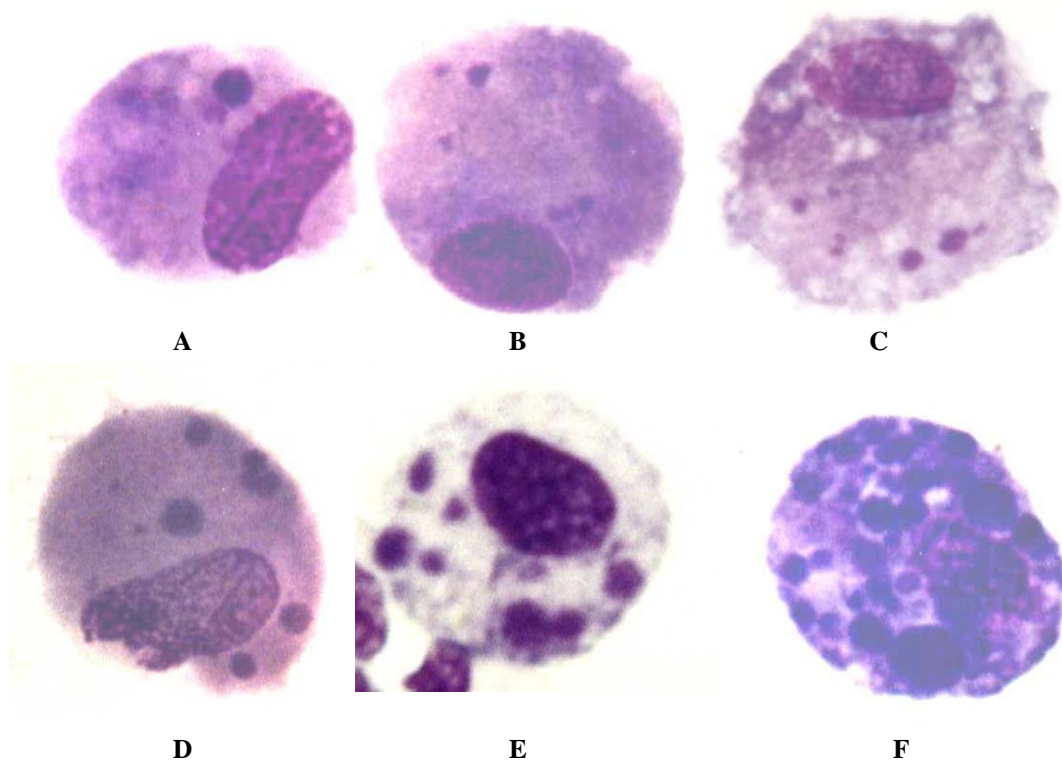


Figura 13. Cultivos Primarios donde se evidencia el incremento en el número de mórulas a diferentes días postinfección. Figuras 13 A, B y C. Noveno día de cultivo. Figuras 13 D y E. Día 13 de cultivo. Figura 13 F. Día 14-15 después de realizar el segundo y el tercer pase. Coloración de Giemsa. 1000X

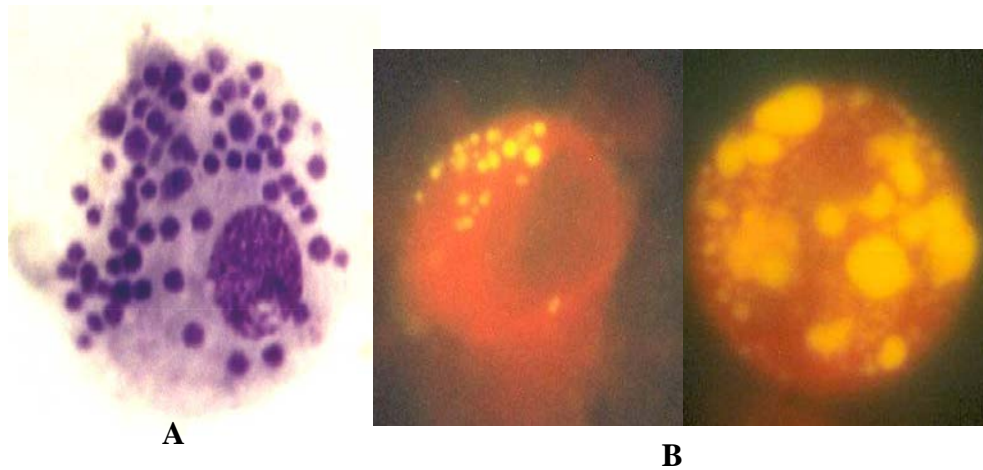


Figura 14. Cultivos Primarios. Figura 14 A. Monocitos con múltiples mórulas intracitoplasmáticas. Coloración de Giemsa 1000X. Figura 14 B. Inmunofluorescencia Directa 1000X

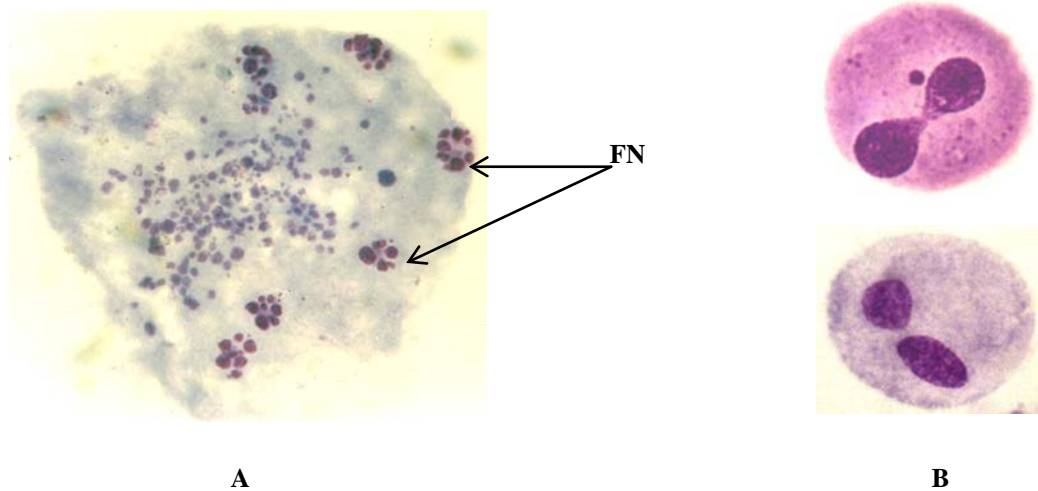
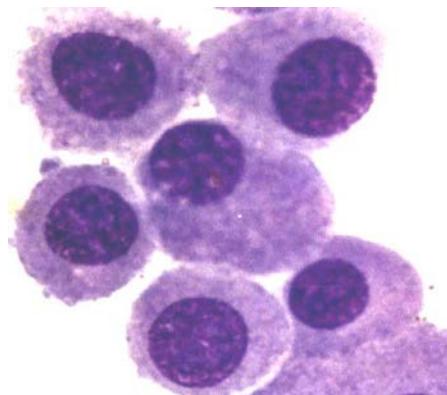


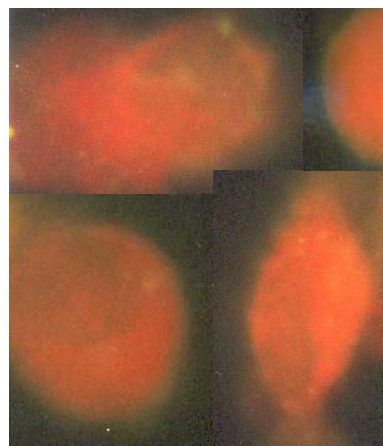
Figura 15 A. Monocito en proceso de destrucción celular en donde se observan fragmentos nucleares (FN). Coloración de Giemsa 1000X. Figura 16 B. Mitosis. Coloración de Giemsa 400X

excepción del período de tiempo necesario para realizar los pases, el cual osciló entre 20 y 25 días, debido a que se mantenía la integridad celular por este tiempo. En el cultivo primario no infectado que se utilizó como control, no se observaron las

inclusiones descritas anteriormente ni por coloración de Giemsa ni por IFD (Figura 16 A y 16 B, respectivamente).



A



B

Figura 16. Control de monocitos no infectados. Figura 16 A. Coloración de Giemsa 400X. Figura 16 B. Inmunofluorescencia Directa. 1000X

Los cultivos celulares DH82, a los que se les añadió tanto los sobrenadantes de los cultivos primarios infectados con SFB como los sedimentos celulares provenientes de cultivos primarios con suero canino, se mantuvieron negativos al concluir los 60 días posinfección.

1.4 Características clínicas, hematológicas y FCB del perro inoculado con los cultivos primarios de monocitos infectados

Con los cultivos primarios se inoculó una perra para comprobar la infectividad de los mismos. Antes de la inoculación el animal no presentaba signos clínicos de Ehrlichiosis Canina y estaba seronegativa a *Ehrlichia canis*. Las cifras hematológicas estaban entre los valores normales: Hb 16,8 gr/dl, Hto 50 %, 191.000 plaquetas/ μ l, 11.500 leucocitos/ μ l con un diferencial de 6.785 neutrófilos/ μ l (59 %), 3.680 linfocitos/ μ l (32 %), 805 eosinófilos/ μ l (7 %) y 230 monocitos/ μ l (2 %).

Los signos clínicos de Ehrlichiosis Canina se manifestaron al sexto día PI con pérdida del apetito y decaimiento. Antes de la inoculación el promedio de la temperatura fue de 38,1°C con un mínimo de 38 °C y un máximo de 38,2 °C; después de la administración del inóculo y antes del tratamiento (día 24 PI) el promedio de la temperatura corporal fue de 38,9 °C con un mínimo de 38 °C y un máximo de 41 °C. Los picos febriles se observaron a los días 15, 22, 23 y 24 PI. Al día siguiente de instaurado el tratamiento, la temperatura disminuyó a 38,1 °C, observándose entre los valores referenciales hasta el día 48 PI (Figura 18). El día 16 PI, el estudio del FCB mostró cuerpos iniciales y mórulas compactas los días 18 y 20 después de la inoculación.

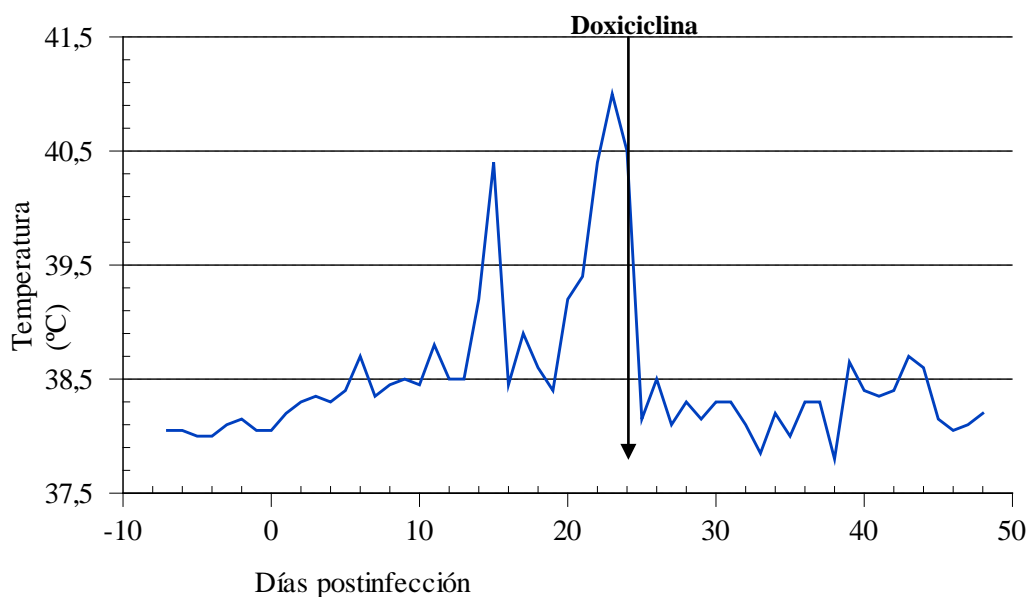


Figura 18. Temperatura rectal 7 días antes y después de la inoculación

A partir del noveno día PI se evidenció disminución de la Hb y el Hto, presentándose anemia para el día 18 PI (9,2 g/dl) (Figura 19). Los recuentos de leucocitos y plaquetas empezaron a disminuir progresivamente partir del sexto día PI, presentándose los valores más bajos entre los días 16 y 18 PI con valores que llegaron a 4.200 leucocitos/ μ l y 31.000 plaquetas/ μ l para el día 18 PI (Figura 20).

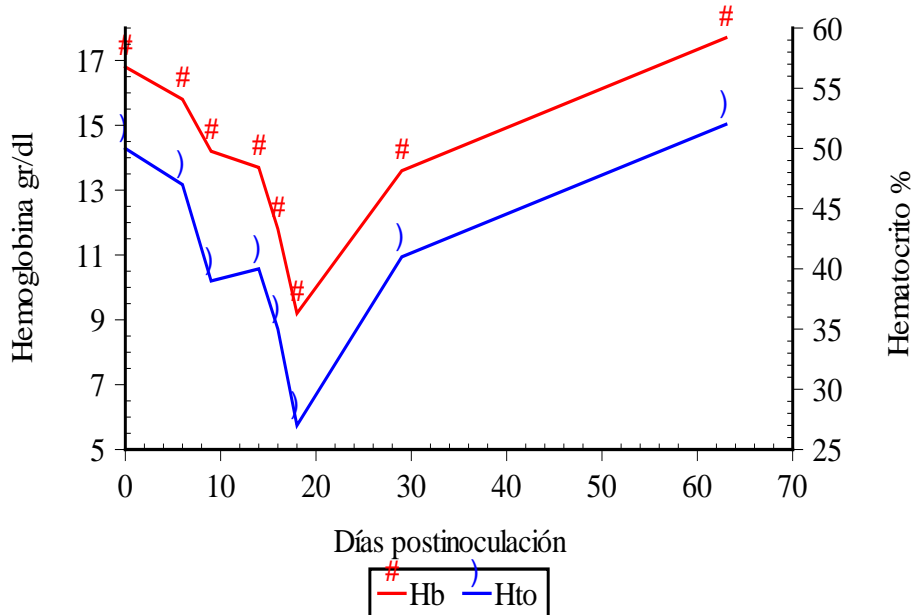


Figura 19. Hemoglobina y Hematocrito después de la inoculación experimental

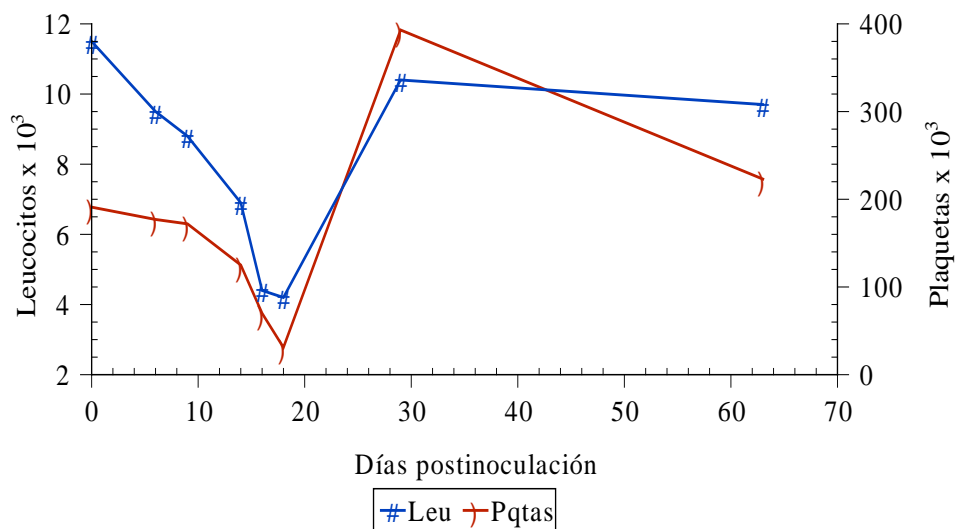


Figura 20. Leucocitos y Plaquetas después de la inoculación experimental

Con relación a la V.S.G., se observó que comenzó a aumentar para el día 14 PI, registrándose un valor máximo de 33 mm/hora el 16 día PI, comenzando a disminuir sin tratamiento para el día 18 PI (Figura 21). Se evidenció seroconversión

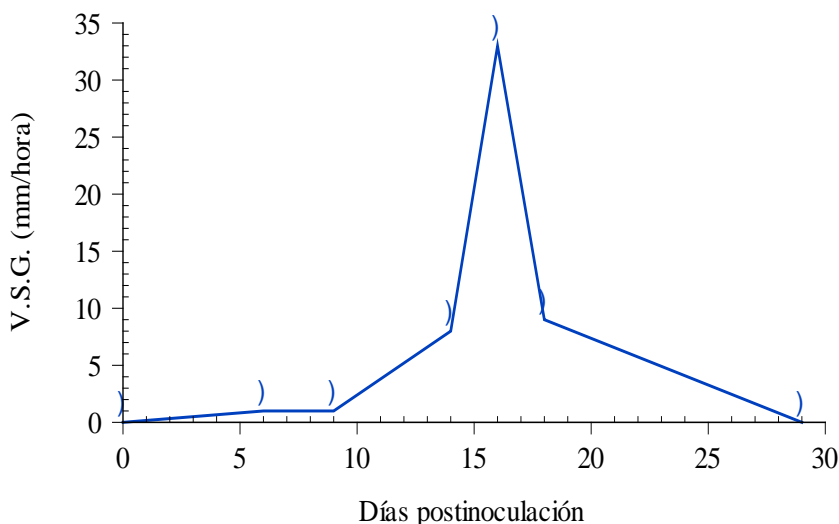


Figura 21. Velocidad de sedimentación globular después de la inoculación experimental

cuando se realizó la serología al decimocuarto día PI, con un título de 1/80. El título de Acs más alto de 1/320 se observó en la determinación realizada el día 32 PI; al quinto día postratamiento los valores de la Hb, Hto, V.S.G., leucocitos y plaquetas retornaron a los referenciales, manteniendo una serología positiva con un título 1/320; se repitieron las evaluaciones hematológicas y serológicas el día 64 PI (día 40 postratamiento) y se observaron que los valores hematológicos estaban dentro de los valores referenciales mientras que la serología se mantuvo positiva con un título de Acs de 1/80.

2. Identificación ultraestructural de *Ehrlichia* sp. a través de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Para demostrar que las inclusiones intracitoplasmáticas en células mononucleares correspondían al género *Ehrlichia* se realizó MET. En una de las muestras procesadas se observaron vacuolas características con cuerpos elementales del organismo Ehrlichial rodeados de una doble membrana: una membrana externa ondulada que forma parte de la pared celular y una membrana plasmática interna. En la Figura 22 se pueden evidenciar cuerpos elementales ovalados que midieron entre

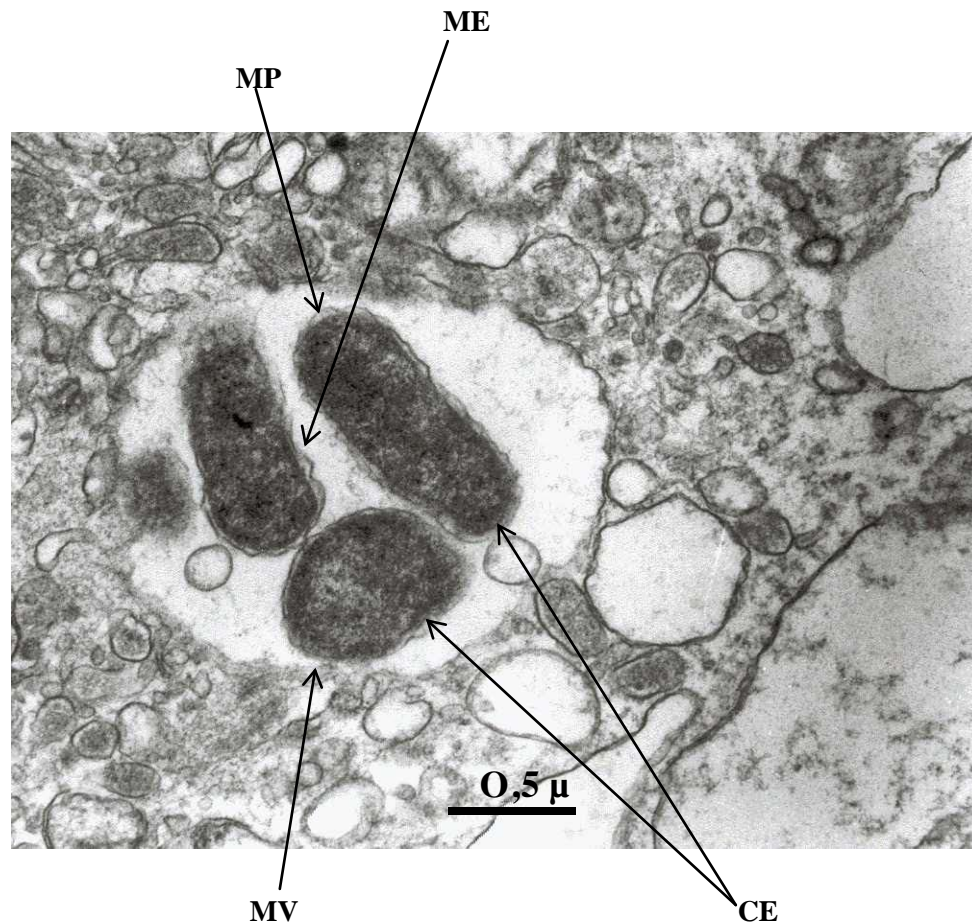


Figura 22. Microscopía Electrónica de Transmisión. Vacuola intracitoplasmática con organismos Ehrlichiales. Cuerpos elementales (CE) con membrana externa (ME) como constituyente de la pared celular y membrana plasmática (MP). Membrana vacuolar (MV).

1 μm x 0,4 μm a 1,2 x 0,5 μm , la vacuola tuvo un diámetro de aproximadamente 2 μm . Los cuerpos elementales estaban constituidos por abundantes gránulos muy agrupados electrondensos que se contrastaron con el acetato de uranilo y escasas áreas claras.

3. Identificación de *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

3.1 Extracción de ADN a partir de muestras sanguíneas

La calidad del ADN obtenido de las muestras de sangre (la recuperación típica fue de 0,1 a 0,4 unidades de absorbancia a 260 nm), fue verificada por corrida electroforética en gel de agarosa al 1 %. En la Figura 23 se puede observar la electroforesis del ADN extraído a partir de muestras sanguíneas de perros. Se puede evidenciar que el ADN (Figura 23, canales 2 al 4) no presenta contaminación con ARN, lo cual se puede demostrar al compararlo con el ADN de *E. coli* usado como control (Figura 23, canal 5) en el que se puede apreciar claramente la contaminación con ARN ribosomal.

3.2 Análisis de secuencias a través del programa Gene Runner

Con la utilización del programa Gene Runner se comprobó la hibridación de los cebadores ECC y ECB en las secuencias del gen ARNr 16S de *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. coli* y la hibridación de los cebadores ECA/HE3 y HE1/HE3 en el fragmento amplificado con los primeros cebadores. Conociendo que el tamaño del fragmento amplificado viene determinado por la distancia entre los dos cebadores se pudo calcular el tamaño teórico de los fragmentos amplificados para cada especie bacteriana. Para *E. canis* y *E. chaffeensis* con los cebadores ECC y ECB se calculó que el fragmento estaría comprendido entre 477 y 478 pb mientras que con *E. coli* se determinó que los cebadores ECC y ECB promueven la amplificación de un

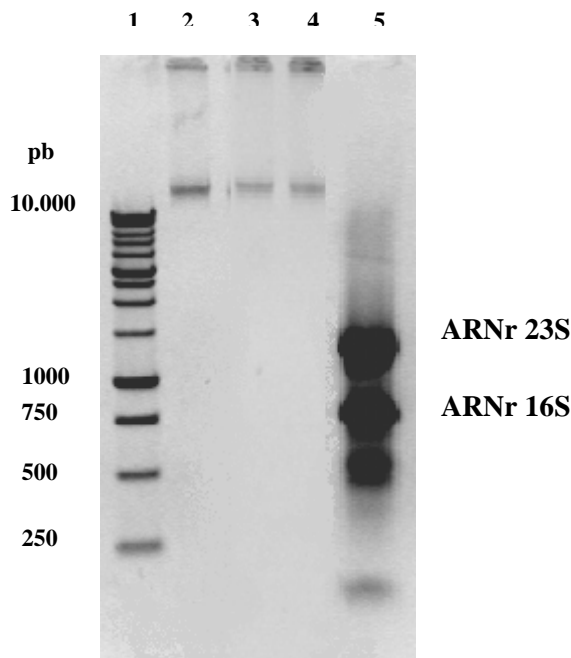


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa de ADN extraído a partir de muestras sanguíneas de perros. Canal 1: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de base); canales 2 al 4: 1µg de ADN extraído de muestras sanguíneas de perro; canal 5: *E. coli*

fragmento de 511 pb, cuando se permite una hibridación con dos errores en el cebador ECC. Esta hibridación imperfecta resultó suficientemente estable en las condiciones para la PCR reportada (Wen *et al.*, 1997). En la Figura 24 se señala la representación esquemática del gen ARNr 16S de *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. coli*, así como los tamaños aproximados de los fragmentos amplificados.

3.3 Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada para el diagnóstico de *E. canis* y *E. chaffeensis*

Una de las características del género *Ehrlichia* es el tropismo por leucocitos circulantes, encontrándose diferentes especies parasitando un mismo tipo celular, tal es el caso de las células mononucleares que pueden estar infectadas por *E. canis* o *E.*

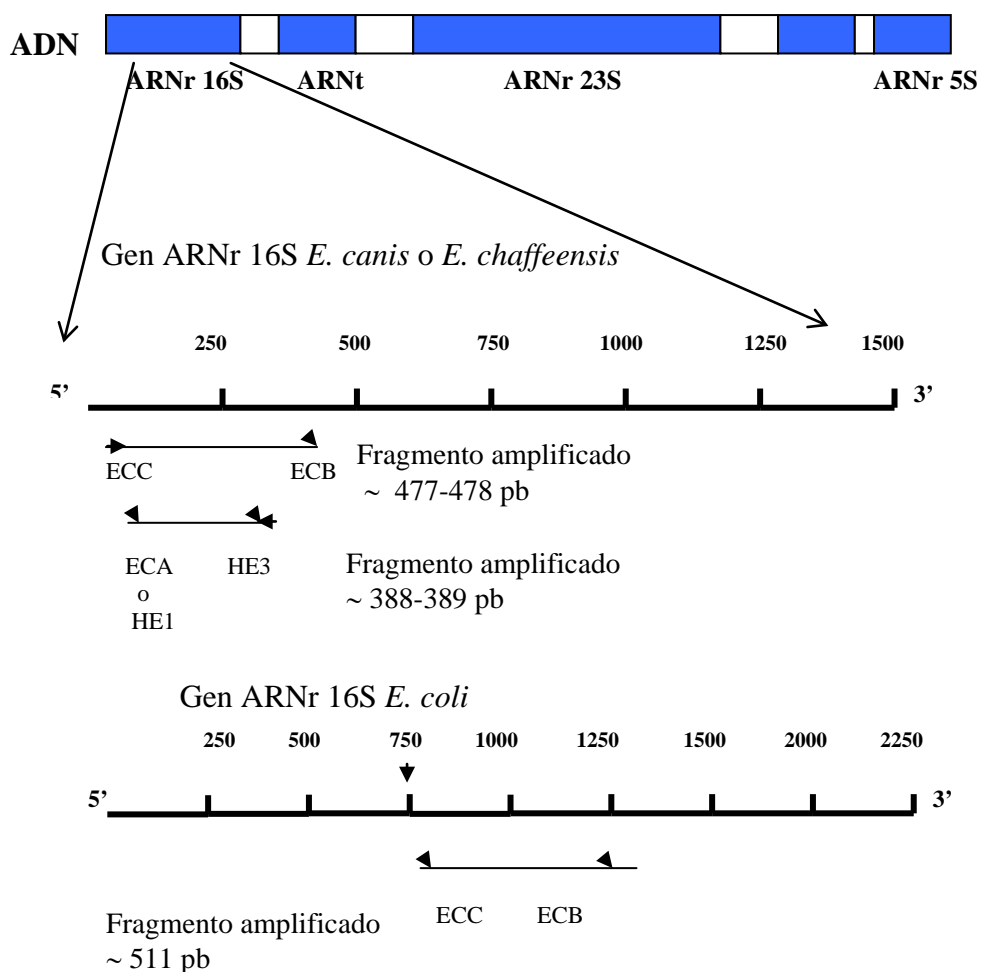


Figura 24. Representación esquemática del gen ARNr 16S en *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. coli*. Hibridación de los cebadores utilizados tanto en la primera como en la segunda PCR

chaffeensis. Debido a que la Ehrlichia objeto de este estudio tiene tropismo por células mononucleares y no se puede diferenciar ni por FCB ni por IFI, se estandarizó la técnica de la PCR con la finalidad de identificar la especie Ehrlichial en las muestras sanguíneas de los perros infectados naturalmente, los cultivos primarios y las muestras sanguíneas de los perros infectados experimentalmente.

Para la estandarización de la primera amplificación utilizando los cebadores ECC y ECB se comenzó con una temperatura de hibridación de 60 °C. En la Figura 25 se observa que a esta temperatura, las bandas correspondientes a 20 ng y 200 ng de

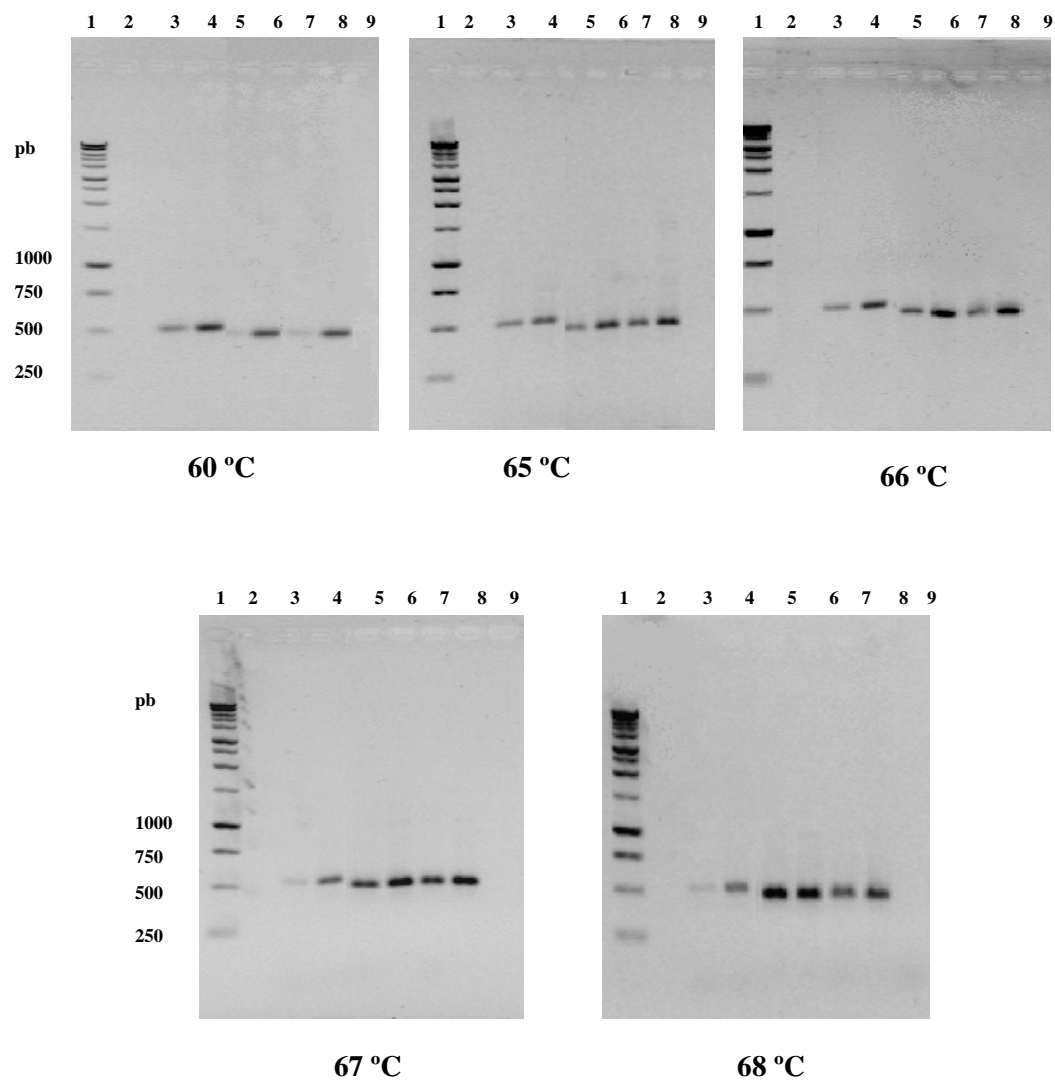


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados utilizando los cebadores ECC/ECB variando la temperatura de hibridación. Canal 1: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de bases); canal 2: 100 ng de ADN de células DH82 no infectadas; canal 3 y 4: 20 ng y 200 ng ADN de *E. coli*; canal 5 y 6: 1 y 10 µl de ADN *E. canis*; canal 7 y 8: 1 y 10 µl de ADN *E. chaffeensis*; canal 9: agua

ADN de *E. coli* eran muy semejantes en lo que respecta a intensidad y grosor de las bandas correspondientes a 1 y 10 μ l del ADN recuperado de células infectadas con *E. canis* y *E. chaffeensis*. Por lo tanto se decidió aumentar la temperatura de hibridación sistemáticamente. Como se puede apreciar en la Figura 25, a medida que aumentó la temperatura de hibridación, las bandas de *E. canis* y *E. chaffeensis* aumentaron en tamaño e intensidad mientras que las de *E. coli* iban disminuyendo. En vista del rendimiento del producto amplificado y de la ausencia de productos secundarios se decidió dejar establecida la temperatura de hibridación en 68 °C.

La Figura 26 corresponde a la corrida electroforética de los productos obtenidos después de la segunda PCR utilizando los cebadores ECA/HE3 para la especie *E. canis* (Figura 26 A) y HE1/HE3 para la especie *E. chaffeensis* (Figura 26 B).

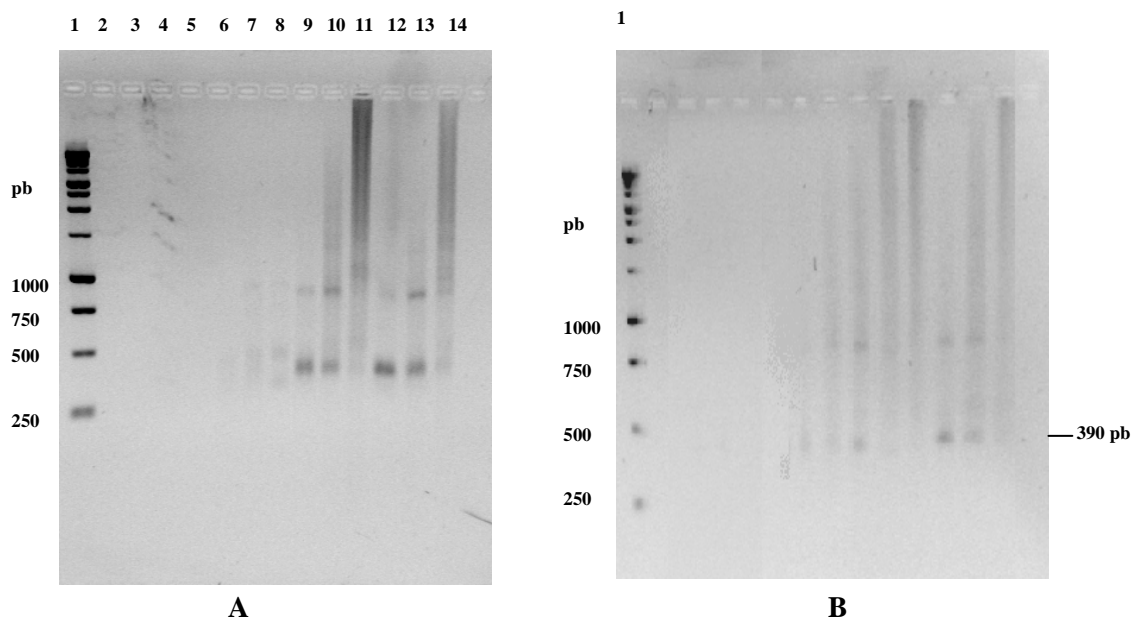


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa de los productos formados durante la segunda PCR (estandarización). Canal 1: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de bases); canales 3, 4 y 5: 1, 2 y 5 μ l de ADN de *E. coli*. Figura 26 A. Canales 6, 7 y 8: 1, 2 y 5 μ l de ADN de *E. chaffeensis*; canales 9, 10 y 11: 1, 2 y 5 μ l de ADN de *E. canis* con cebador ECA sin calentar; canales 12, 13 y 14: 1, 2 y 5 μ l de ADN de *E. canis* con cebador ECA calentado. Figura 26 B. Canales 6, 7 y 8: 1, 2 y 5 μ l de ADN de *E. canis*; canales 9, 10 y 11: 1, 2 y 5 μ l de ADN de *E. chaffeensis* con cebador HE1 sin calentar; canales 12, 13 y 14: 1, 2 y 5 μ l de ADN de *E. chaffeensis* con cebador HE1 calentado.

En este experimento se ensayaron tres volúmenes (1, 2 y 5 μ l) del producto formado en la primera PCR como plantilla de ADN para la segunda amplificación usando los cebadores ECA o HE1 tal como se obtienen del proveedor (no calentado) o precalentados a 80 °C por dos minutos antes de añadirlos a la mezcla de reacción. Se observó una mejor definición del producto amplificado con el volumen de 1 μ l y precalentando los cebadores (Figura 26 A y 26 B, canal 12). También puede observarse que no hubo amplificación cuando se usaron los pares de cebadores ECA/HE3 y HE1/HE3 con el ADN de *E. coli* formado en la primera PCR (Figura 26 A y 26 B, canales 3, 4 y 5). Cuando se utilizó como molde la muestra con ADN de *E. chaffeensis* y los cebadores ECA/HE3, no se observó fragmento amplificado (Figura 26 A, canales 6, 7 y 8); igual ocurrió cuando se realizó la amplificación utilizando como ADN *E. canis* y los cebadores HE1/HE3 (Figura 26 B, canales 6, 7 y 8). Con estos ensayos se demostró la alta especificidad intergénero e interespecie de los cebadores ECA/HE3 y HE1/HE3.

3.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada de las muestras sanguíneas de los perros infectados naturalmente

En la Figura 27 está representada la fotografía de la electroforesis en gel de agarosa, en el cual corrieron los productos de la primera PCR (cebadores ECC/ECB) realizada con 1 μ l de ADN extraído de las muestras sanguíneas de los perros diagnosticados con Ehrlichiosis Canina por signos clínicos y FCB. En el canal 13 se puede observar el control positivo correspondiente al ADN de *E. canis* con una banda aproximadamente de 490 pb; en el canal 11 se colocó el control negativo (ADN de células DH82 no infectadas); en el canal 12 agua en lugar de ADN. Las muestras de los productos amplificados con las muestras de ADN de los perros N° 1 al N° 9 se colocaron en los canales 2 al 10. En las muestras correspondientes a los perros N° 1, N° 2; N° 3; N° 5 y N° 8 se visualizan bandas bien definidas iguales al control positivo; en los perros N° 4 y N° 6 se formaron bandas débiles mientras que en los

perros N° 7 y N° 9 no hubo formación de productos amplificados. La Figura 28 A y 28 B representa lo mismo que la Figura 27 pero con 10 μ l de ADN extraído de las

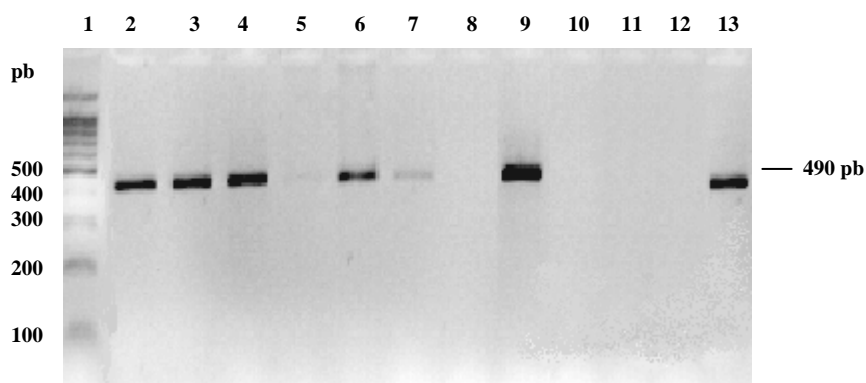


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la primera PCR utilizando 1 μ l de ADN extraído de muestras sanguíneas de perros infectados naturalmente. Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pb: pares de bases); canales 2 al 10: perros N° 1 al N° 9; canal 11: control negativo; canal 12: agua; canal 13: control positivo

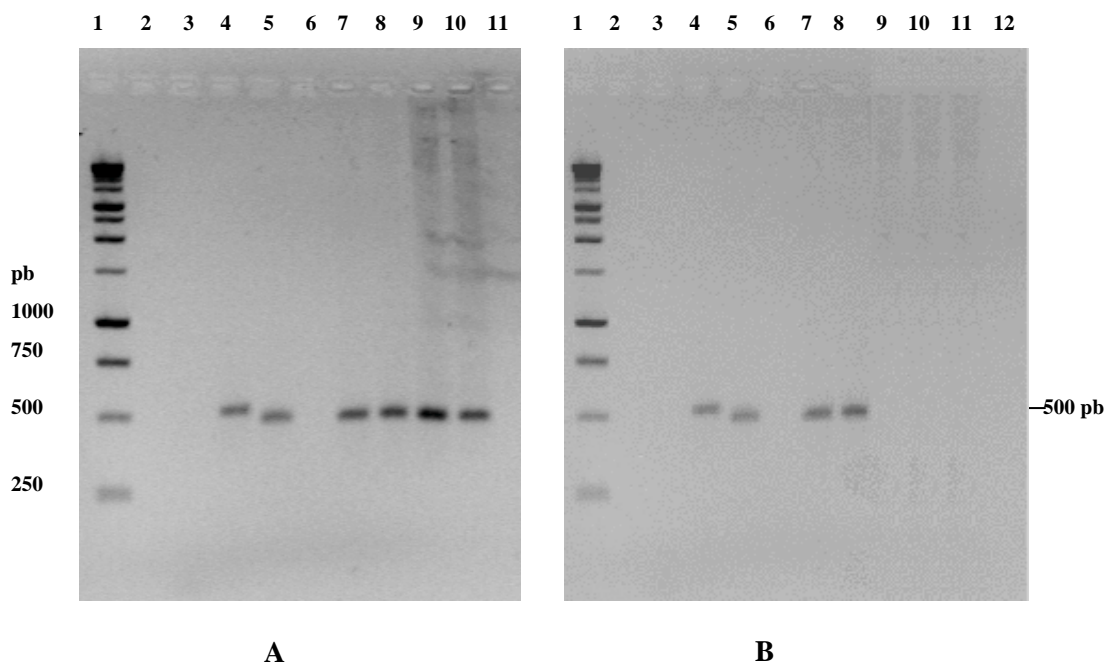


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la primera PCR utilizando 10 μ l de ADN extraído de muestras sanguíneas de perros infectados naturalmente. Figura 28 A y 28 B. Canal 1: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de bases); canal 3: control negativo; canal 4: control positivo; canal 5: control positivo. Figura 28 A. Canales 7 al 10: perros N° 1 al N° 4; canal 11: agua. Figura 28 B. Canales 7 al 11: perros N° 5 al N° 9; canal 12: agua.

muestras sanguíneas. Los controles están representados de la siguiente manera: control negativo, ADN extraído de células DH82 no infectadas (canal 3 de ambas Figuras); control positivo de un amplificado de otro género bacteriano, ADN de *E.coli* (canal 4 de ambas Figuras) en donde se observa una banda de aproximadamente 510 pb; control positivo, ADN extraído de *E. canis* (canal 5 de ambas Figuras) con una banda de aproximadamente 500 pb; control de los reactivos agua en lugar de ADN (canal 11 en la Figura 28 A y canal 12 en la Figura 28 B). De los 9 perros ensayados en 6 de ellos (canales 7 al 10 de la Figura 28 A, perros N° 1 al N° 4 y canales 7 y 8 de la Figura 28 B, perros N° 5 y N° 6) se visualizó una banda igual a la observada en el control de *E. canis* (resultado positivo), mientras que en tres de los 9 (canales 9, 10 y 11 Figura 28 B, perros N° 7 al N° 9) no se visualizó ninguna banda (resultado negativo).

La Figura 29 representa la corrida electroforética de los productos de la segunda PCR en la cual los productos de la primera PCR (realizada con 1µl de ADN) sirvieron como plantilla de ADN para la segunda, utilizando los cebadores específicos para la especie *E. canis* (ECA/HE3). Los controles y las muestras correspondientes a los perros se colocaron en el mismo orden que están en la Figura 27. Se puede visualizar bandas bien definidas de los productos amplificados en las muestras de los perros N° 1, N° 2, N° 5, N° 6 y N° 8; bandas débiles de los productos amplificados de los perros N° 3 y N° 4; en la muestra concerniente al perro N° 7 no se formó producto amplificado. La Figura 30 es la representación de la corrida electroforética de los productos de la segunda PCR realizada con los productos de la primera PCR (con 10 µl de ADN) utilizando los mismos cebadores anteriores. El control negativo y el de los reactivos fueron los mismos que se utilizaron en la primera PCR y se colocaron en los mismos canales de las Figuras 28 A y 28 B. Se observa que con el producto de *E. coli* no hubo amplificación (canal 4 en ambas Figuras, control negativo de otro género bacteriano). En el canal 5 de ambas figuras se visualiza una banda de aproximadamente 390 a 400 pb correspondiente al ADN de *E. canis*. En los canales 7 al 10 de la Figuras 30 A y 7 al 11 de la Figura 30 B (Figura A: perros N° 1 al N° 4 y

Figura B: perros N° 5 al N° 9) se formaron amplificadores correspondientes a las muestras de todos los perros ensayados a excepción del perro N° 8 (canal 10, Figura

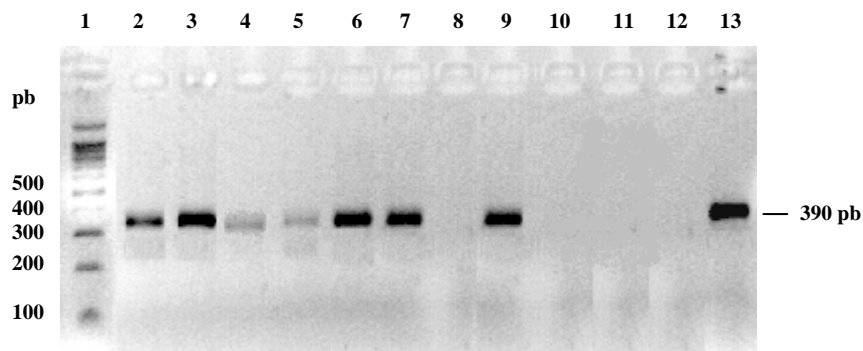


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de la segunda PCR (cebadores ECA/HE3) realizada con los productos de la primera PCR (1 μ l de ADN extraído de muestras sanguíneas). Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pb: pares de bases); canal 2 al 10: perros N° 1 al N° 9; canal 11: control negativo; canal 12: agua; canal 13: control positivo.

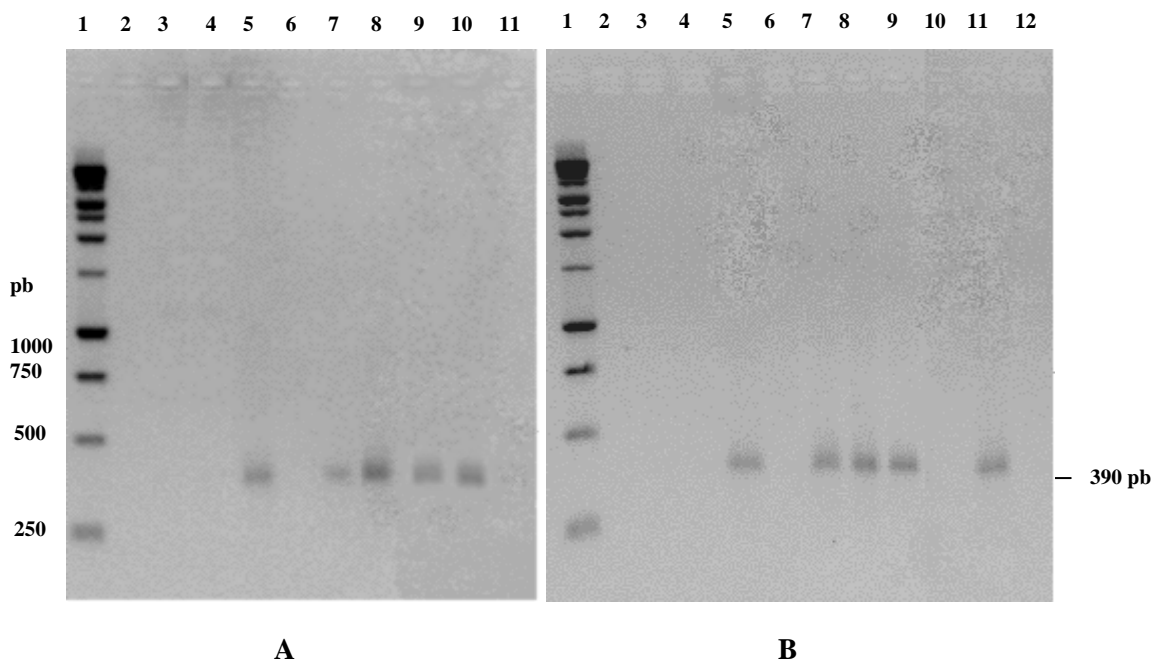


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de la segunda PCR (cebadores ECA/HE3) realizada con los productos de la primera PCR (10 μ l de ADN extraído de muestras sanguíneas). Fig. 30 A y 30 B. Canal 1: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de bases); canal 3: control negativo; canal 4: control negativo; canal 5: control positivo. Fig. 30 A. Canales 7 al 10: perros N° 1 al N° 4; canal 11: agua. Fig. 30 B. Canales 7 al 11: perros N° 5 al N° 9; canal 12: agua.

30 B).

Los productos amplificados en la primera PCR utilizando los cebadores ECB/ECC con 1 μ l y 10 μ l de ADN también se ensayaron en una segunda PCR con los cebadores HE1/HE3 para la especie *E. chaffeensis*. En la Figura 31 se presenta la fotografía de la corrida electroforética en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR utilizando como plantilla de ADN los productos amplificados en la primera PCR (realizada con 1 μ l de ADN extraído de las muestras sanguíneas). En este gel de agarosa se colocó en el canal 13 el control positivo (ADN de *E. chaffeensis*), en el canal 11 el control negativo (ADN de células DH82 no infectadas), canal 12 agua en vez de ADN, en los canales 2 al 10 las muestras de los productos correspondientes a los perros N° 1 al N° 9. Se puede observar que no hubo amplificación con las muestras de los perros, la única banda que se reconoce es la correspondiente al control positivo (canal 13). La fotografía de la corrida electroforética de los productos de la segunda PCR efectuada con los productos de la primera PCR (la cual se llevó a cabo con 10 μ l de ADN extraído de las muestras sanguíneas) se puede observar en la Figura 32. Los controles y muestras se colocaron en el mismo orden en que están colocados en la figura del gel anterior. En esta fotografía se puede evidenciar que utilizando los cebadores específicos para *E. chaffeensis* (HE1/HE3) amplificaron los productos de la primera PCR correspondientes a los perros N° 1, N° 2, N° 6 y N° 8 (canales 2, 3, 7 y 9 respectivamente). Los productos de la primera PCR de los perros N° 3, N° 4, N° 5, N° 7 y N° 9 no amplificaron con los cebadores utilizados.

Se obtuvo sangre de un perro infectado naturalmente con signos clínicos de Ehrlichiosis Canina para ser utilizada como inóculo del perro infectado experimentalmente, a partir del cual se obtuvieron los cultivos primarios infectados. En la Figura 33 se observa la electroforesis de los productos de la primera PCR con 1 y 10 μ l de ADN extraído de la muestra sanguínea, usando los cebadores ECC y ECB. En esta PCR se incluyeron los siguientes controles: control de los reactivos, agua en lugar de ADN (canal 3), control negativo, ADN extraído de células DH82 no

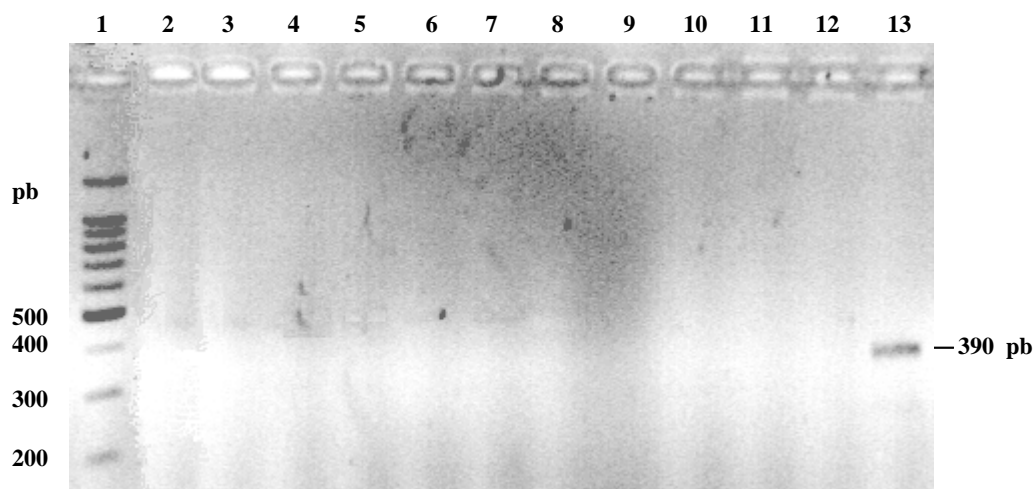


Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de la segunda PCR (cebadores HE1/HE3) realizada con los productos de la primera PCR (1 μ l de ADN extraído de muestras sanguíneas de perros infectados naturalmente). Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pb: pares de bases); canal 2 al 10: perros N° 1 al N° 9; canal 11: control negativo; canal 12: agua; canal 13: control positivo.

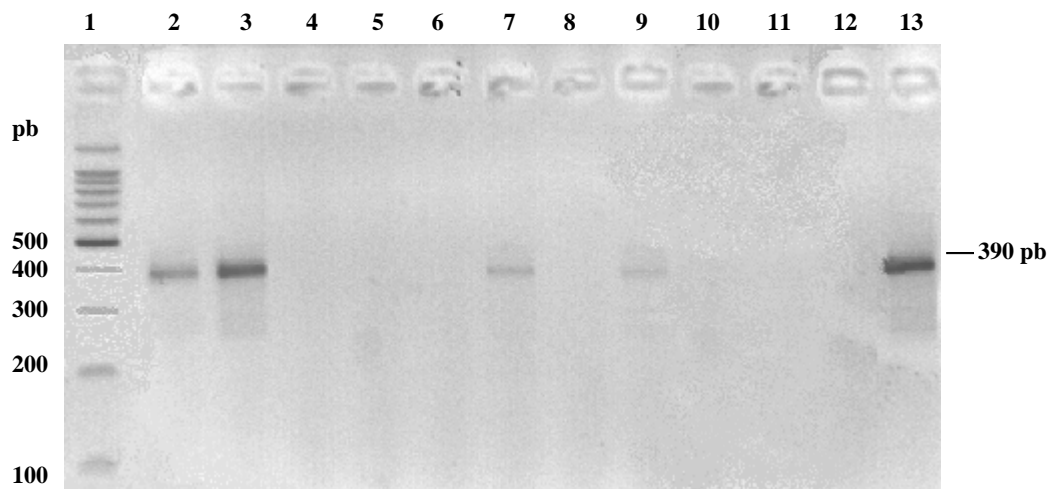


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de la segunda PCR (cebadores HE1/HE3) realizada con los productos de la primera PCR (10 μ l de ADN extraído de muestras sanguíneas de perros infectados naturalmente). Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pb: pares de bases); canal 2 al 10: perros N° 1 al N° 9; canal 11: control negativo; canal 12: agua; canal 13: control positivo.

infectadas (canal 4); control positivo de otro género bacteriano, ADN obtenido de *E. coli* (canal 7); controles positivos, ADN extraído de *E. canis* y *E. chaffeensis* (canales 8 y 9). En esta fotografía se observa con 10 μ l de ADN obtenido de la muestra canina (canal 6) una banda igual a la formada con los controles positivos de aproximadamente 500 pb, con 1 μ l de ADN extraído no hubo formación de banda (canal 5).

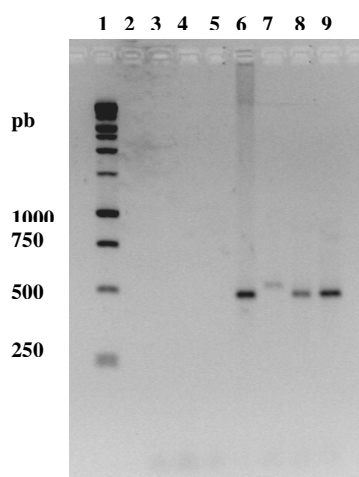


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la primera PCR a partir del ADN extraído de la muestra sanguínea del perro utilizado como inóculo. Canal 1: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de bases); canal 3: agua; canal 4: control negativo; canal 5 y 6: 1 μ l y 10 μ l de ADN; canal 7: control positivo (*E. coli*); canal 8 y 9: controles positivos

La Figura 34 es la fotografía de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR. En este caso se utilizó como plantilla de ADN 1 μ l de cada uno de los productos de la PCR anterior y los cebadores para *E. canis* ECA/HE3 (Fig. 34 A) y *E. chaffeensis* HE1/HE3 (Fig. 34 B). El control de reactivos y negativo fueron los mismos de la PCR anterior y se colocaron en los mismos canales de la Figura 33. Como puede observarse en el canal 7 de las Figuras 34 A y 34 B no se formaron bandas con el producto del ADN extraído de *E. coli* (control negativo). En el canal 8 de la Figura 34 A no hubo amplificación a partir del producto formado con ADN extraído de *E. chaffeensis* utilizando los cebadores específicos para la especie

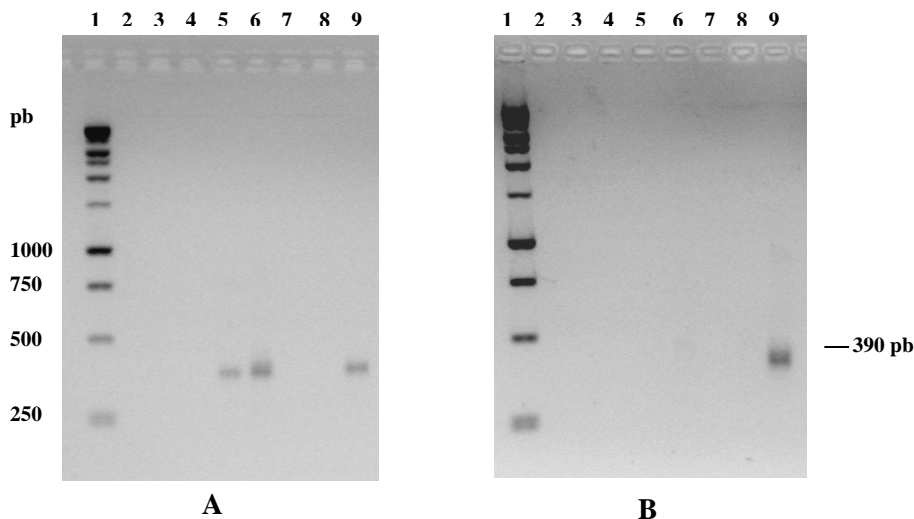


Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR realizada con los productos de la primera PCR con ADN extraído de la muestra sanguínea utilizada como inóculo. **Figura 34 A y 34 B.** Canal 1: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de bases); canal 3: agua; canal 4: control negativo, canal 5 y 6: 1 μ l y 10 μ l de ADN del perro; canal 7: control negativo. **Figura 34 A** (cebadores ECA/HE3). Canal 8: control negativo; canal 9: control positivo. **Figura 34 B** (cebadores HE1/HE3). Canal 8: control negativo; canal 9: control positivo

E. canis, ECA/HE1 (control negativo) y lo mismo ocurrió en el canal 8 de la Figura 34 B con el producto formado con ADN extraído de *E. canis* utilizando los cebadores específicos para la especie *E. chaffeensis* HE1/HE3 (control negativo). En el canal 5 y 6 de la Figura 34 A se visualizan dos bandas tanto con el producto correspondiente a 1 μ l como con 10 μ l de ADN extraído de la muestra canina de 380 a 400 pb igual a la observada en el control positivo (canal 9), mientras que en la Figura 34 B la única banda formada es la del control positivo (canal 9, ADN extraído de *E. chaffeensis*).

3.5 PCR anidada del perro inoculado experimentalmente y de los cultivos primarios obtenidos de este perro

Las Figuras 35 y 36 muestran la corrida electroforética de la primera y segunda ronda de PCR (cebadores ECB/ECC y ECA/HE3 respectivamente) con las muestras de ADN del perro inoculado experimentalmente. En la primera PCR los controles

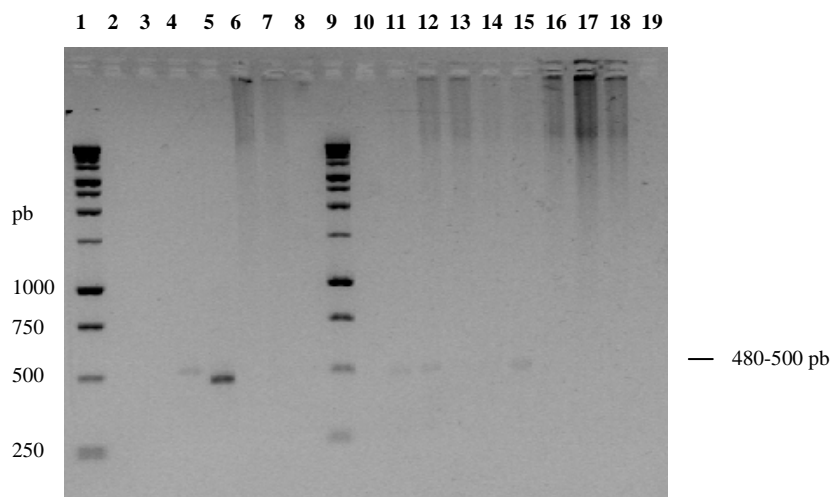


Figura 35. Electroforesis de los productos de la primera PCR realizada con 10 μ l de ADN extraído de las muestras sanguíneas del perro inoculado experimentalmente. Canal 1 y 9: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de base); canal 3: control negativo; canal 4: control positivo (*E. coli*); canal 5: control positivo; canal 6: día 0 de la inoculación experimental; canal 7 día 10 PI; canal 11: día 14 PI; canal 12: día 17 PI; canal 13: día 19 PI; canal 14: día 23 PI; canal 15: día 32 PI; canal 16: día 43 PI; canal 17: día 50 PI; canal 18: día 73 PI; canal 19: agua

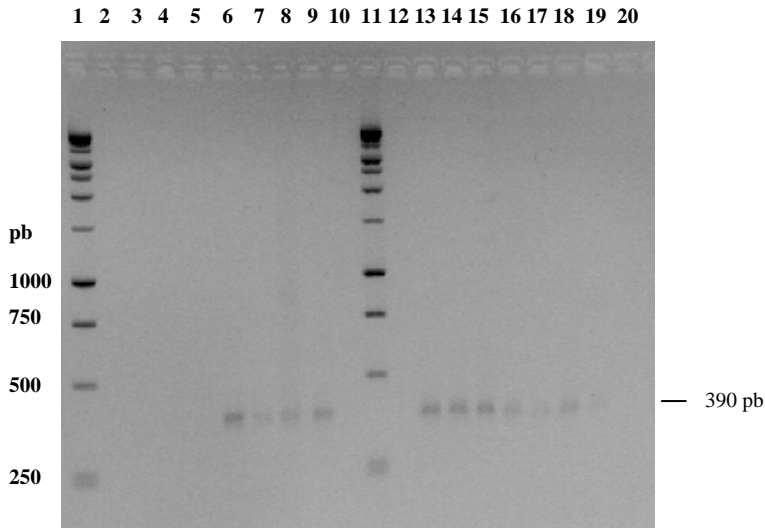


Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR (cebadores: ECA/HE3) del perro inoculado experimentalmente. Canal 1 y 11: marcador de peso molecular de 1 Kb (pares de base); canal 3: control negativo; canal 4: control negativo; canal 5: control negativo; canal 6: control positivo; canal 7: día 0 de la inoculación experimental; canal 8: día 10 PI; canal 9: día 14 PI; canal 13: día 17 PI; canal 14: día 19 PI; canal 15: día 23 PI; canal 16: día 32 PI; canal 17: día 43 PI; canal 18: día 50 PI; canal 19: día 73 PI; canal 20: agua

utilizados estuvieron conformados por uno negativo, obtenido a partir del ADN de células DH82 sin infectar (canal 3); dos controles positivos correspondientes al ADN de *E. coli* y ADN de *E. canis* (canales 4 y 5 respectivamente), los cuales pueden visualizarse como bandas de 510 pb para el control de *E. coli* y entre 480-500 pb para *E. canis*.

Los productos amplificados en la primera PCR con el ADN de células DH82 sin infectar, ADN de *E. coli* y ADN de *E. chaffeensis* se emplearon como controles negativos de la segunda ronda de PCR (Figura 36, canales 3, 4 y 5 respectivamente); el producto de la primera PCR con el ADN de *E. canis* sirvió como control positivo (Figura 36, canal 6) y se evidencia como una banda de aproximadamente 390 pb. En la Figura 35 se pueden visualizar bandas ligeras de aproximadamente 500 pb en los canales 11, 12 y 15 correspondientes a los días PI 14, 17 y 32 PI, mientras que en la Figura 36 (segunda PCR) se observan bandas muy ligeras de 400 pb el día de la inoculación (día 0, canal 7), 43 PI (canal 17) y el día 73 PI (canal 19, 23 días después de iniciado el tratamiento). En esta misma Figura se observa como paulatinamente va aumentando la intensidad de las bandas en los días 10, 14, 17, 19 y 23 PI (canales 8, 9, 13, 14 y 15).

La segunda ronda de PCR también se realizó utilizando los cebadores específicos para la especie *E. chaffeensis* (HE1/HE3) y los productos amplificados en la primera PCR correspondientes al control negativo (células DH82 no infectadas, canal 6), control positivo (*E. chaffeensis*, canal 7) y las muestras de los días 0, 10, 14 y 17 PI (canales 2, 3, 4 y 5); después que se llevó a cabo la PCR hubo amplificación en el control positivo y en las muestras lo que se evidenció como bandas de aproximadamente 390 pb en el gel utilizado para la corrida electroforética (Figura 37).

De este perro infectado experimentalmente se obtuvieron cultivos primarios. Se extrajo el ADN de las alícuotas almacenadas a -70°C de los cultivos primarios infectados número 1 (día 14 después de haber sido sembrado), número 2 (día doce

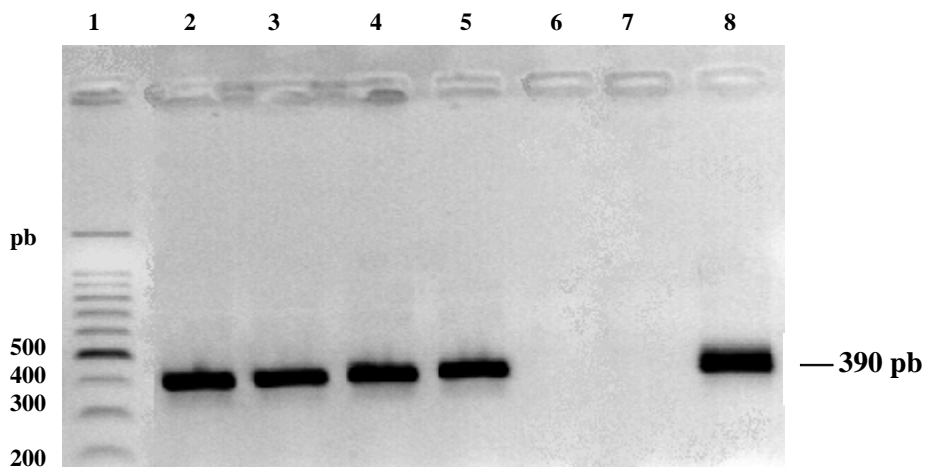


Figura 37. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR (cebadores: HE1/HE3) del perro inoculado experimentalmente. Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pares de base); canal 2: día 0 de la inoculación experimental; canal 3: día 10 PI; canal 4: día 14 PI; canal 5: día 17 PI; canal 6: control negativo; canal 7: agua; canal 8: control positivo

después de realizar el primer pase), número 3 (sobrenadante a los seis días de haber realizado el segundo pase), número 4 (día 15 después de realizar el tercer pase). La Figura 38 representa la electroforesis en gel de agarosa de los productos formados en la primera PCR utilizando los cebadores de género ECC y ECB. Se puede observar una banda entre 490 a 500 pb con el ADN *E. chaffeensis* y *E. canis* utilizados como controles positivos del género *Ehrlichia* (canales 3 y 4 respectivamente). Se evidencian bandas de aproximadamente 490 a 500 pb con 10 μ l de ADN del cultivo N° 1 y cultivo N° 2 (canales 7 y 9, respectivamente). Con 1 y 10 μ l de ADN del sobrenadante del cultivo N° 3 no hubo amplificación (canales 10 y 11), mientras que con 1 y 10 μ l de ADN del cultivo N° 4 se formó una banda intensa con 10 μ l (canal 13).

Luego se llevó a cabo la segunda ronda de PCR con los cebadores específicos ECA/HE3 (Figura 39, *E. canis*) y HE1/HE3 (Figura 40, *E. chaffeensis*). En ambos casos se utilizaron 1 μ l de los productos de la primera PCR realizada con 10 μ l de ADN de las muestras de los cultivos primarios N° 1, N° 2 y N° 3. Se incluyó un

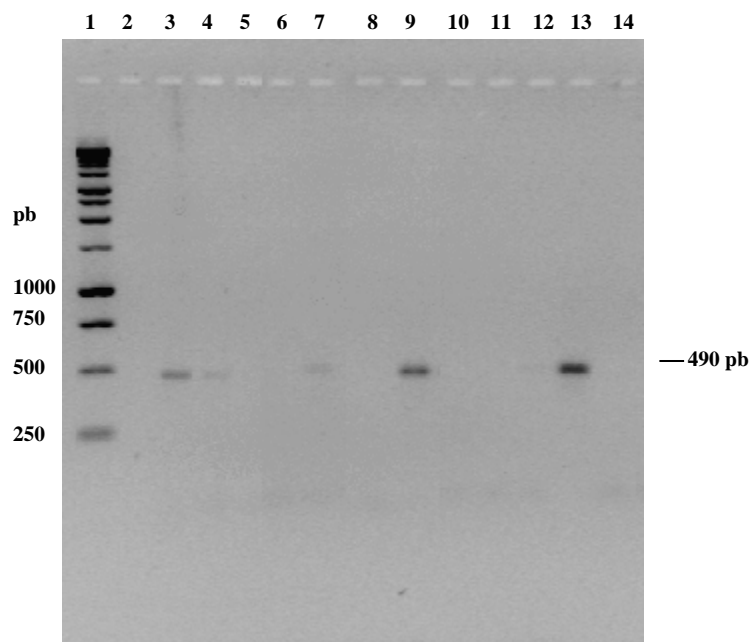


Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la primera PCR de los cultivos primarios infectados. Canal 1: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de base); canal 3: control positivo (*E. chaffeensis*); canal 4: control positivo (*E. canis*); canal 5: control negativo; canales 6 y 7: 1 y 10 μ l ADN del cultivo primario N° 1; canales 8 y 9: 1 y 10 μ l ADN del cultivo primario N° 2; canales 10 y 11: 1 y 10 μ l ADN del cultivo primario N° 3 (sobrenadante); canales 12 y 13: 1 y 10 μ l ADN del cultivo primario N° 4; canal N° 14: control de reactivos (agua)

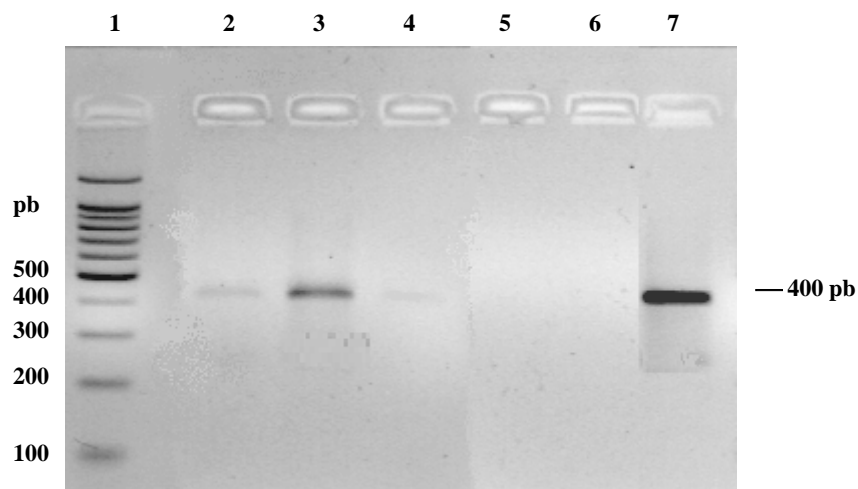


Figura 39. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR con los cultivos primarios (cebadores ECA/HE3). Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pares de base); canales 2 al 4: cultivos primarios N° 1, N° 2 y N° 3; canal 5: control negativo; canal 6: agua; canal 7: control positivo

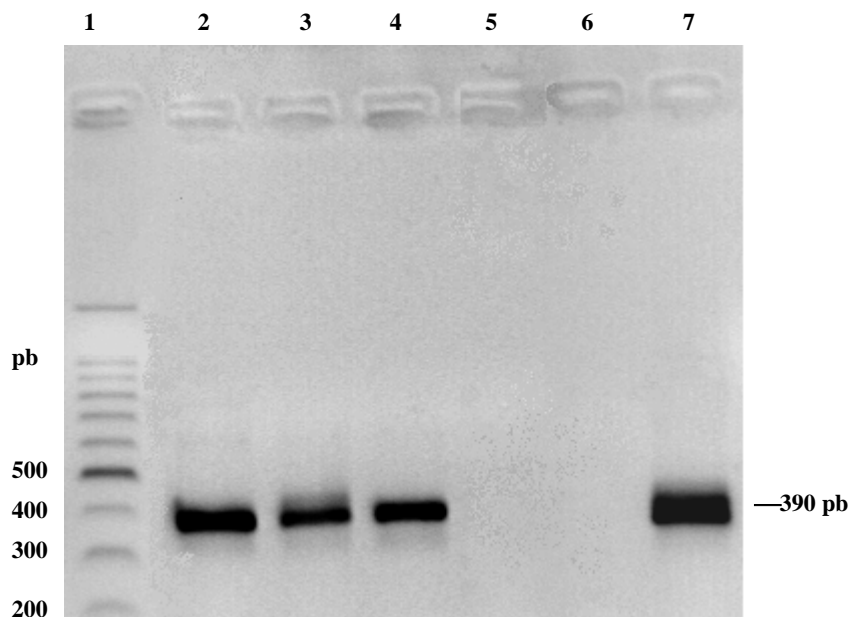


Figura 40. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR con los cultivos primarios (cebadores HE1/HE3). Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pares de base); canales 2 al 4: cultivos primarios N° 1, N° 2 y N° 3; canal 5: control negativo; canal 6: agua; canal 7: control positivo

control negativo (producto de la primera PCR llevada a cabo con el ADN de las células DH82, canal 5 de las dos Figuras) y un control positivo (producto de la primera PCR efectuada con el ADN de *E. canis*, canal 7 de la Figura 39 y *E. chaffeensis* canal 7 de la Figura 40). En las dos Figuras se puede observar que después de realizada la segunda PCR y corrido los productos en el gel, amplificaron las muestras correspondientes al control positivo y las muestras de los cultivos; esto se evidencia en el gel como bandas de aproximadamente 400 pb.

3.6 PCR del perro inoculado con los cultivos primarios de monocitos infectados

A la perra inoculada con los cultivos primarios se le extrajo sangre antes de la inoculación (día 0) y a los días 6, 9, 14, 18, 21, 26, 46 y 64 días PI. Estas muestras se almacenaron a -70°C y luego se descongelaron con la finalidad de extraerles el ADN

y realizar la primera ronda de PCR con los cebadores ECC y ECB cuyos resultados se muestran en la Figura 41. Se puede observar una banda de aproximadamente 510 pb con el ADN de *E. coli* utilizado como control positivo (canal 4), una banda de 500 pb con el control positivo del género *Ehrlichia* (ADN de *E. canis*, canal 5). Con respecto a las muestras de ADN (10 µl) analizadas del animal inoculado se puede evidenciar que se formaron productos representados por bandas de 500 pb iguales a las del control positivo a los días 9, 14, 18 y 25 PI, siendo esta última muy tenue (canales 8, 9, 10 y 12).

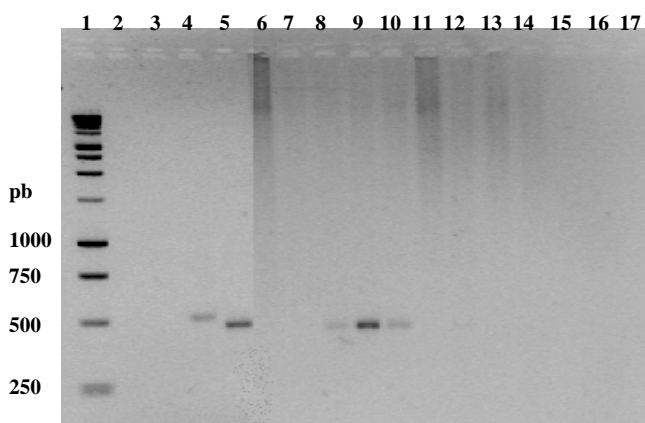


Figura 41. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la primera PCR del perro inoculado experimentalmente utilizando como inóculo cultivos primarios. Canal 1: marcadores de peso molecular (pb: pares de base); canal 3: control negativo (ADN de células DH82); canal 4: control positivo; canal 5: control positivo; canal 6: día 0 de la inoculación experimental; canal 7 al 14: día 6, 9, 14, 18, 21, 25, 46 y 64 PI; canal 15: agua

La segunda ronda de PCR se efectuó con los productos de la primera PCR realizada con el control negativo (células DH82 sin infectar, canal 10 de la Figura 42 y Figura 43) control positivo (*E. canis* y *E. chaffeensis*, canales 12 de la Figura 42 y Figura 43 respectivamente) y los productos de la primera PCR efectuada con 10 µl del ADN de las muestras correspondientes a los días 0, 6, 14, 18, 21, 25, 46 y 64 PI. Esta PCR se realizó utilizando los cebadores para la especie *E. canis* (ECA/HE3, Figura 42) y *E. chaffeensis* (HE1/HE3, Figura 43). En los canales 3, 7 y 8 de la Figura 42 se

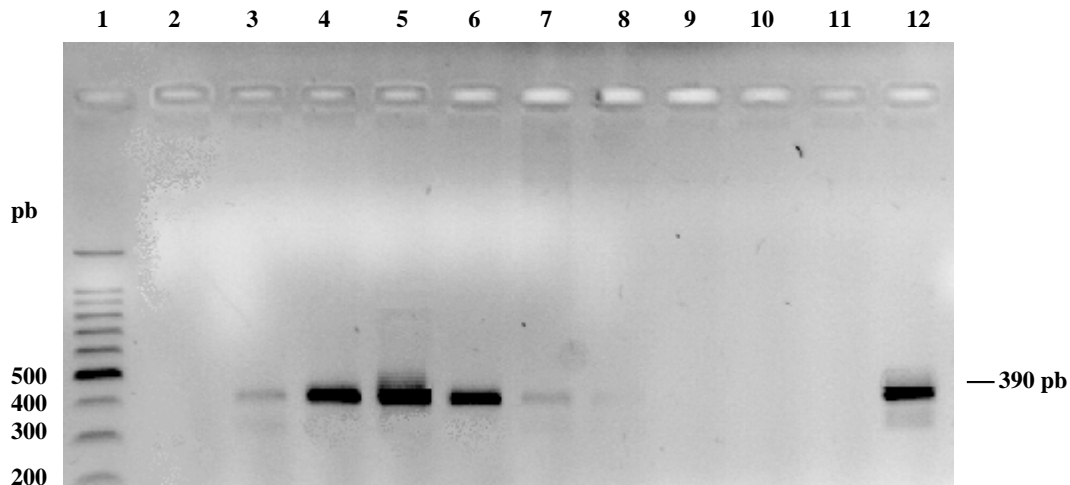


Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR (cebadores: ECA/HE3) del perro inoculado experimentalmente con los cultivos primarios. Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pares de base); canal 2: día 0 de la inoculación experimental; canal 3: día 6 PI; canal 4: día 14 PI; canal 5: día 18 PI; canal 6: día 21 PI; canal 7: día 25 PI; canal 8: día 46 PI; canal 9: día 64 PI; canal 10: control negativo; canal: 11: agua; canal 12: control positivo

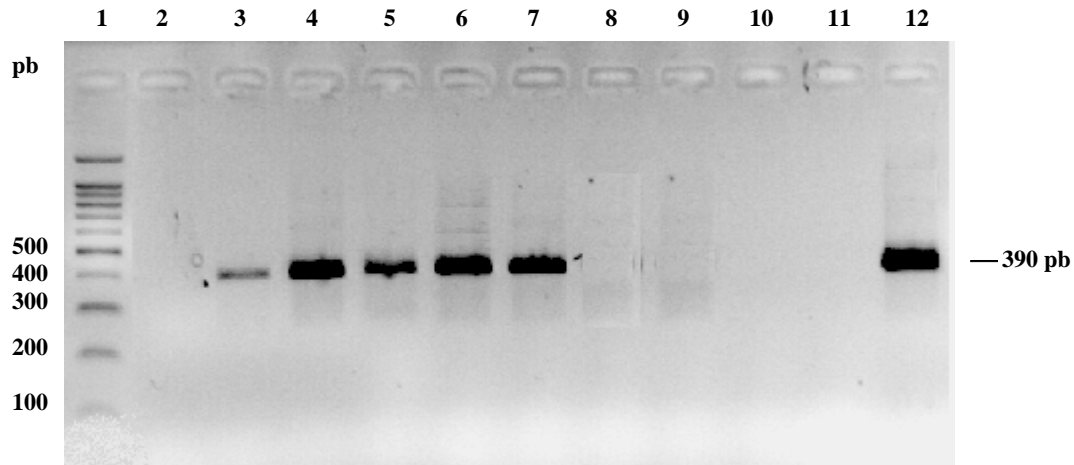


Figura 43. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR (cebadores: HE1/HE3) del perro inoculado experimentalmente con los cultivos primarios. Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pares de base); canal 2: día 0 de la inoculación experimental; canal 3: día 6 PI; canal 4: día 14 PI; canal 5: día 18 PI; canal 6: día 21 PI con; canal 7: día 25 PI; canal 8: día 46 PI; canal 9: día 64 PI; canal 10: control negativo; canal: 11: agua; canal 12: control positivo

observan bandas tenues de aproximadamente 390 pb correspondientes a los días 6, 25 y 46 PI. También se evidencian bandas bien definidas en los canales 4, 5 y 6 pertenecientes a los días 14, 18 y 21 PI iguales a la observada en el control positivo. En el gel representado en la Figura 45 todas las bandas observadas son bien definidas y corresponden al control positivo y a los días 6, 14, 18, 21 y 25 PI (canales 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente).

Los signos clínicos de Ehrlichiosis Canina se manifestaron al sexto día PI con pérdida del apetito y decaimiento. Antes de la inoculación el promedio de la temperatura fue de 38,1°C con un mínimo de 38 °C y un máximo de 38,2 °C; después de la administración del inóculo y antes del tratamiento (día 24 PI) el promedio de la temperatura corporal fue de 38,9 °C con un mínimo de 38 °C y un máximo de 41 °C. Los picos febriles se observaron a los días 15, 22, 23 y 24 PI. Al día siguiente de instaurado el tratamiento, la temperatura disminuyó a 38,1 °C, observándose entre los valores referenciales hasta el día 48 PI (Figura 17). El día 16 PI, el estudio del FCB mostró cuerpos iniciales y mórulas compactas los días 18 y 20 después de la inoculación.

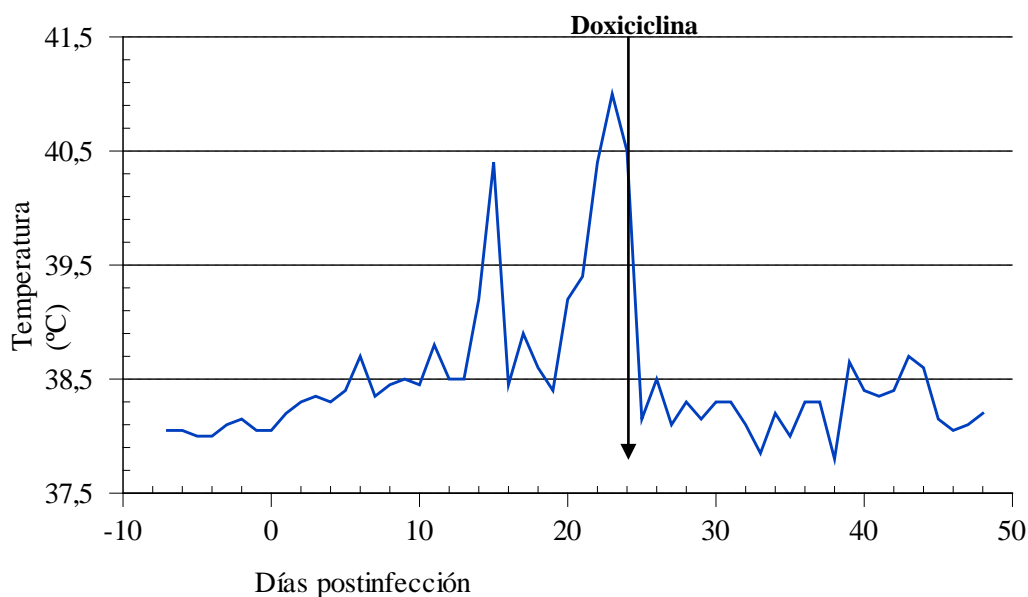


Figura 17. Temperatura rectal 7 días antes y después de la inoculación

A partir del noveno día PI se evidenció disminución de la Hb y el Hto, presentándose anemia para el día 18 PI (9,2 g/dl) (Figura 18). Los recuentos de leucocitos y plaquetas empezaron a disminuir progresivamente partir del sexto día PI, presentándose los valores más bajos entre los días 16 y 18 PI con valores que llegaron a 4.200 leucocitos/ μ l y 31.000 plaquetas/ μ l para el día 18 PI (Figura 19).

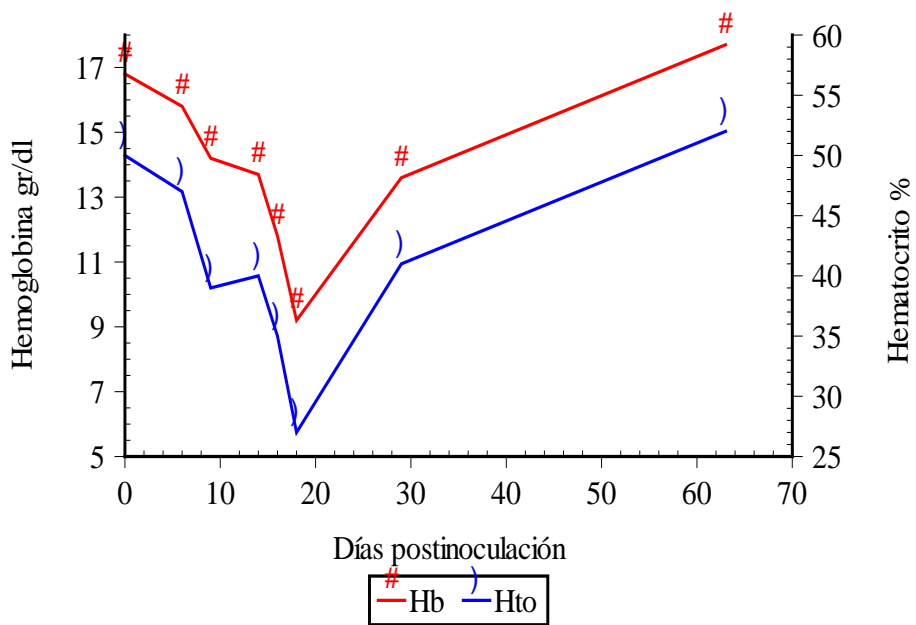


Figura 18. Hemoglobina y Hematocrito después de la inoculación experimental

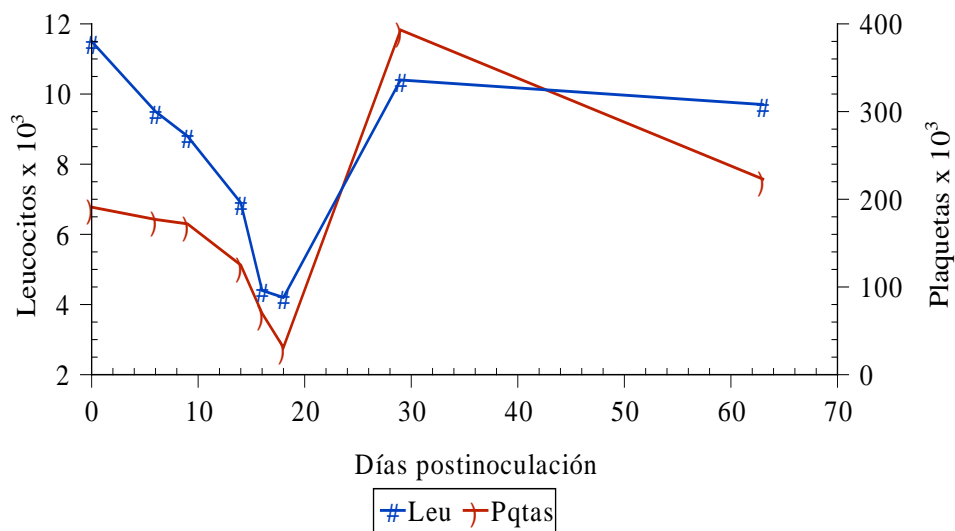


Figura 19. Leucocitos y Plaquetas después de la inoculación experimental

Con relación a la V.S.G., se observó que comenzó a aumentar para el día 14 PI, registrándose un valor máximo de 33 mm/hora el 16 día PI, comenzando a disminuir sin tratamiento para el día 18 PI (Figura 20). Se evidenció seroconversión

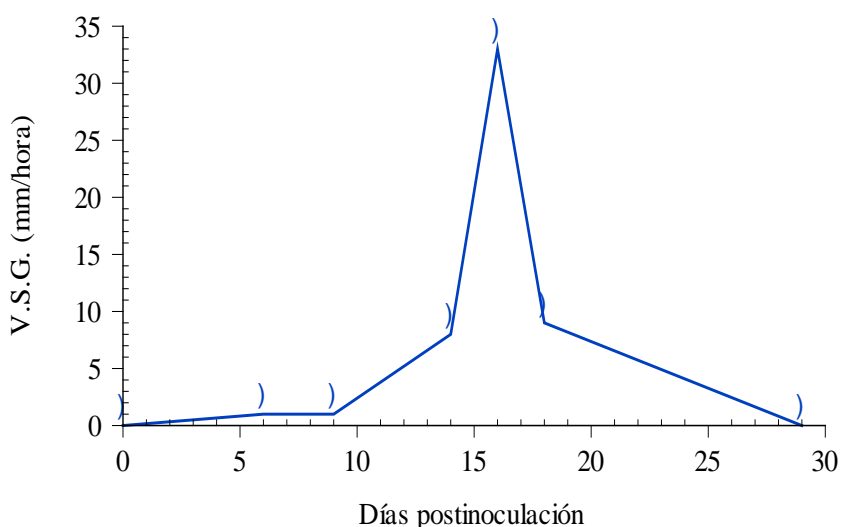


Figura 20. Velocidad de sedimentación globular después de la inoculación experimental

cuando se realizó la serología al decimocuarto día PI, con un título de 1/80. El título de Acs más alto de 1/320 se observó en la determinación realizada el día 32 PI; al quinto día postratamiento los valores de la Hb, Hto, V.S.G., leucocitos y plaquetas retornaron a los referenciales, manteniendo una serología positiva con un título 1/320; se repitieron las evaluaciones hematológicas y serológicas el día 64 PI (día 40 postratamiento) y se observaron que los valores hematológicos estaban dentro de los valores referenciales mientras que la serología se mantuvo positiva con un título de Acs de 1/80.

2. Identificación ultraestructural de *Ehrlichia* sp. a través de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Para demostrar que las inclusiones intracitoplasmáticas en células mononucleares correspondían al género *Ehrlichia* se realizó MET. En una de las muestras procesadas se observaron vacuolas características con cuerpos elementales del organismo Ehrlichial rodeados de una doble membrana: una membrana externa ondulada que forma parte de la pared celular y una membrana plasmática interna. En la Figura 21 se pueden evidenciar cuerpos elementales ovalados que midieron entre

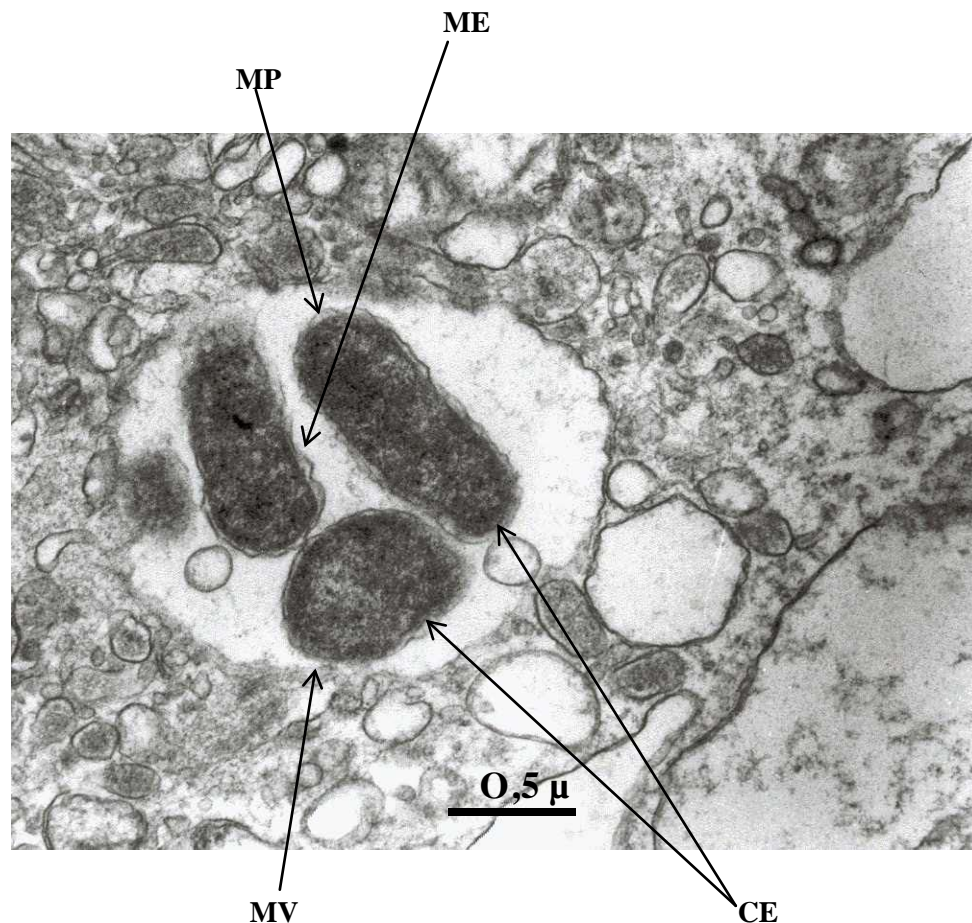


Figura 21. Microscopía Electrónica de Transmisión. Vacuola intracitoplasmática con organismos Ehrlichiales. Cuerpos elementales (CE) con membrana externa (ME) como constituyente de la pared celular y membrana plasmática (MP). Membrana vacuolar (MV).

1 μm x 0,4 μm a 1,2 x 0,5 μm , la vacuola tiene un diámetro de aproximadamente 2 μm . Los cuerpos elementales estaban constituidos por abundantes gránulos muy agrupados electrondensos que se contrastaron con el acetato de uranilo y escasas áreas claras.

3. Identificación de *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

3.1 Extracción de ADN a partir de muestras sanguíneas

La calidad del ADN obtenido de las muestras de sangre (la recuperación típica fue de 0,1 a 0,4 unidades de absorbancia a 260 nm), fue verificada por corrida electroforética en gel de agarosa al 1 %. En la Figura 22 se puede observar la electroforesis del ADN extraído a partir de muestras sanguíneas de perros. Se puede evidenciar que el ADN (Figura 22, canales 2 al 4) no presenta contaminación con ARN, lo cual se puede demostrar al compararlo con el ADN de *E. coli* usado como control (Figura 22, canal 5) en el que se puede apreciar claramente la contaminación con ARN ribosomal.

3.2 Análisis de secuencias a través del programa Gene Runner

Con la utilización del programa Gene Runner se comprobó la hibridación de los cebadores ECC y ECB en las secuencias del gen ARNr 16S de *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. coli* y la hibridación de los cebadores ECA/HE3 y HE1/HE3 en el fragmento amplificado con los primeros cebadores. Conociendo que el tamaño del fragmento amplificado viene determinado por la distancia entre los dos cebadores se pudo calcular el tamaño teórico de los fragmentos amplificados para cada especie bacteriana. Para *E. canis* y *E. chaffeensis* con los cebadores ECC y ECB se calculó que el fragmento estaría comprendido entre 477 y 478 pb mientras que con *E. coli* se determinó que los cebadores ECC y ECB promueven la amplificación de un

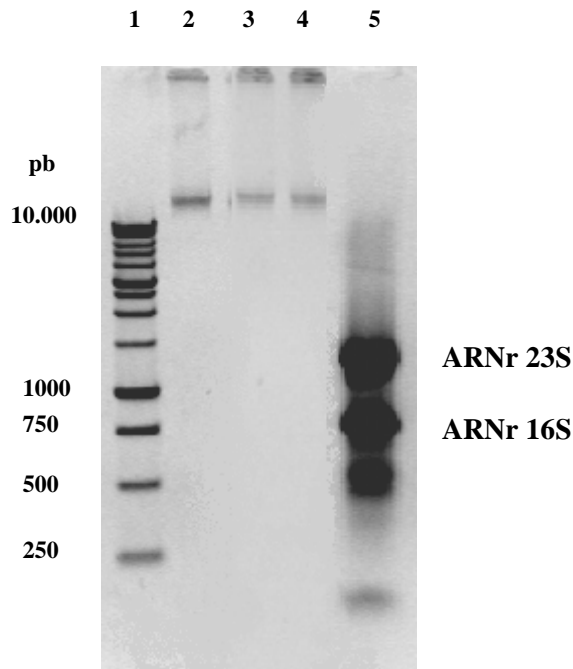


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa de ADN extraído a partir de muestras sanguíneas de perros. Canal 1: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de base); canales 2 al 4: 1µg de ADN extraído de muestras sanguíneas de perro; canal 5: *E. coli*

fragmento de 511 pb, cuando se permite una hibridación con dos errores en el cebador ECC. Esta hibridación imperfecta resultó suficientemente estable en las condiciones para la PCR reportada (Wen *et al.*, 1997). En la Figura 23 se señala la representación esquemática del gen ARNr 16S de *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. coli*, así como los tamaños aproximados de los fragmentos amplificados.

3.3 Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada para el diagnóstico de *E. canis* y *E. chaffeensis*

Una de las características del género *Ehrlichia* es el tropismo por leucocitos circulantes, encontrándose diferentes especies parasitando un mismo tipo celular, tal es el caso de las células mononucleares que pueden estar infectadas por *E. canis* o *E.*

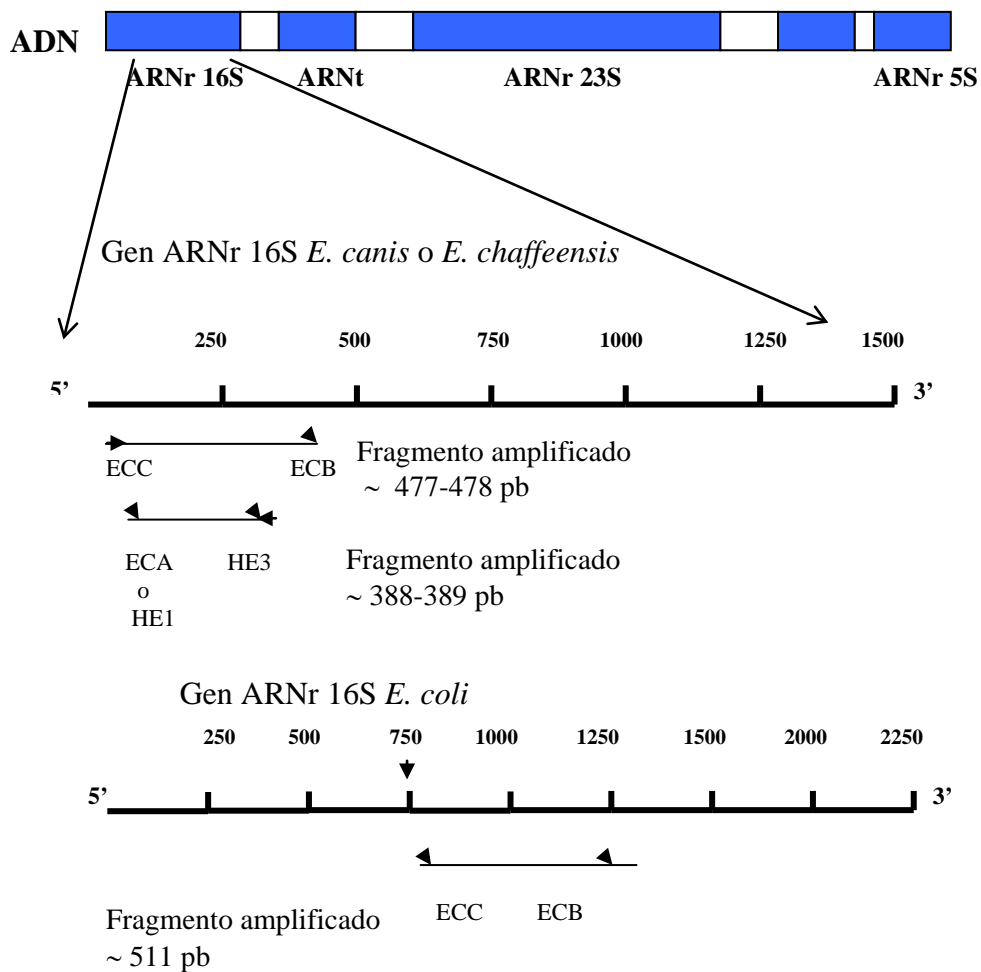


Figura 23. Representación esquemática del gen ARNr 16S en *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. coli*. Hibridación de los cebadores utilizados tanto en la primera como en la segunda PCR

chaffeensis. Debido a que la Ehrlichia objeto de este estudio tiene tropismo por células mononucleares y no se puede diferenciar ni por FCB ni por IFI, se estandarizó la técnica de la PCR con la finalidad de identificar la especie Ehrlichial en las muestras sanguíneas de los perros infectados naturalmente, los cultivos primarios y las muestras sanguíneas de los perros infectados experimentalmente.

Para la estandarización de la primera amplificación utilizando los cebadores ECC y ECB se comenzó con una temperatura de hibridación de 60 °C. En la Figura 24 se observa que esta temperatura, las bandas correspondientes a 20 ng y 200 ng de

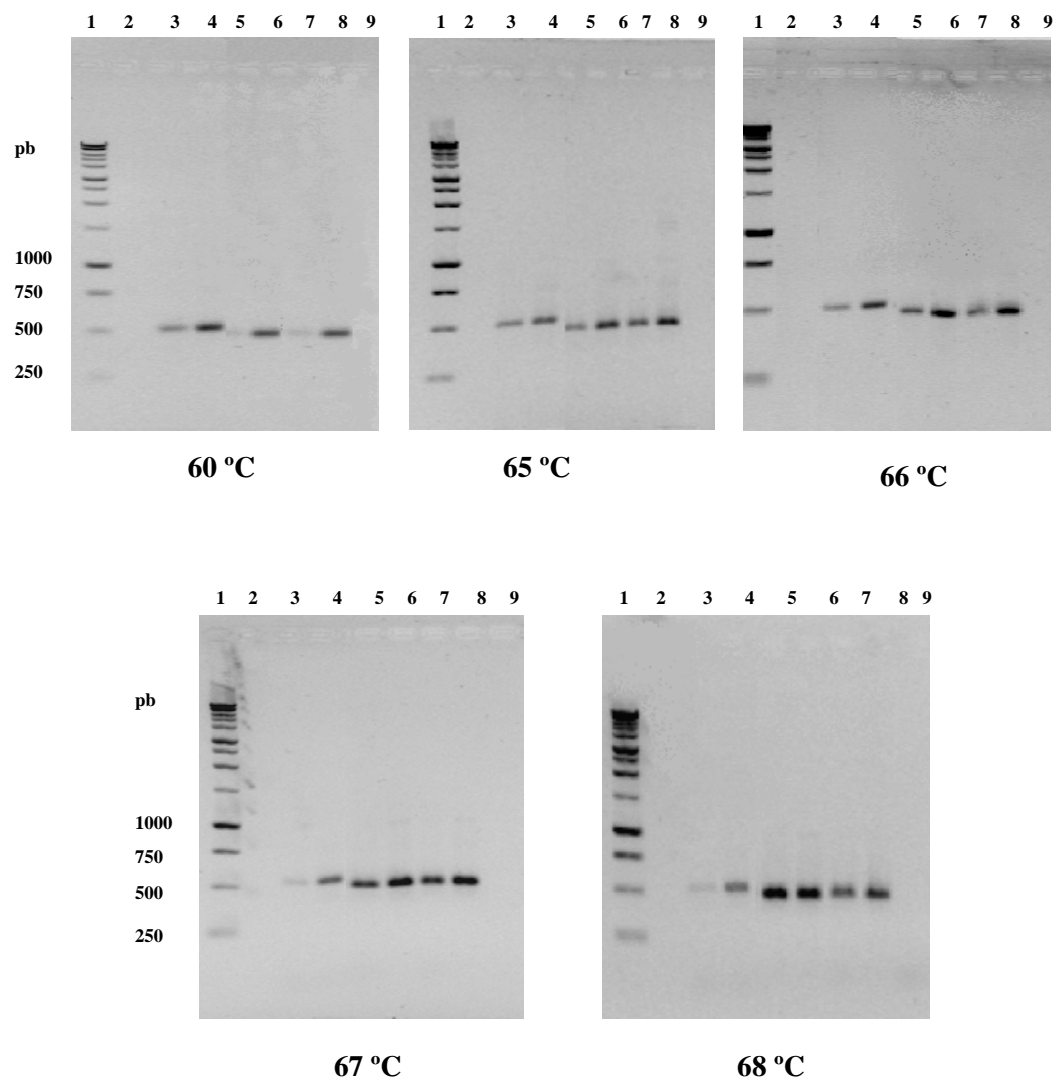


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados utilizando los cebadores ECC/ECB variando la temperatura de hibridación. Canal 1: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de bases); canal 2: 100 ng de ADN de células DH82 no infectadas; canal 3 y 4: 20 ng y 200 ng ADN de *E. coli*; canal 5 y 6: 1 y 10 µl de ADN *E. canis*; canal 7 y 8: 1 y 10 µl de ADN *E. chaffeensis*; canal 9: agua

ADN de *E. coli* eran muy semejantes en lo que respecta a intensidad y grosor de las bandas correspondientes a 1 y 10 μ l del ADN recuperado de células infectadas con *E. canis* y *E. chaffeensis*. Por lo tanto se decidió aumentar la temperatura de hibridación sistemáticamente. Como se puede apreciar en la Figura 24, a medida que aumentó la temperatura de hibridación, las bandas de *E. canis* y *E. chaffeensis* aumentaron en

tamaño e intensidad mientras que las de *E. coli* iban disminuyendo. En vista del rendimiento del producto amplificado y de la ausencia de productos secundarios se decidió dejar establecida la temperatura de hibridación en 68 °C.

La Figura 25 corresponde a la corrida electroforética de los productos obtenidos después de la segunda PCR utilizando los cebadores ECA/HE3 para la especie *E. canis* (Figura 25 A) y HE1/HE3 para la especie *E. chaffeensis* (Figura 25 B).

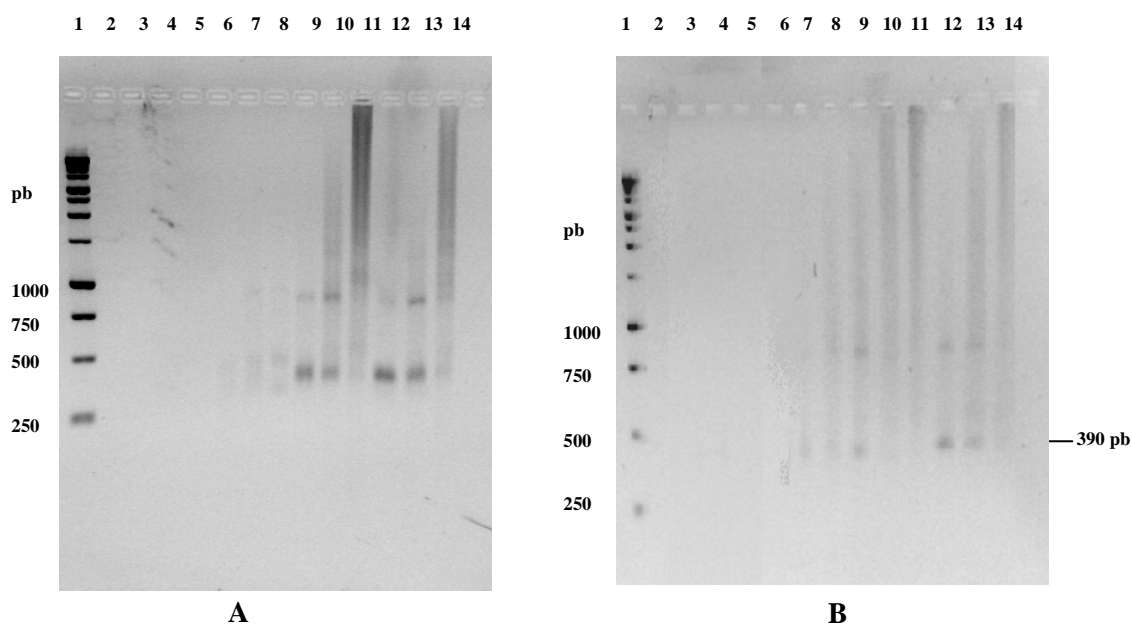


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa de los productos formados durante la segunda PCR (cebadores de especie). Canal 1: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de bases); canales 3, 4 y 5: 1, 2 y 5 μ l de ADN de *E. coli*. Figura 26 A (cebadores ECA/HE3). Canales 6, 7 y 8: 1, 2 y 5 μ l de ADN de *E. chaffeensis*; canales 9, 10 y 11: 1, 2 y 5 μ l de ADN de *E. canis* con cebador ECA sin calentar; canales 12, 13 y 14: 1, 2 y 5 μ l de ADN de *E. canis* con cebador ECA calentado. Figura 26 B (cebadores HE1/HE3). Canales 6, 7 y 8: 1, 2 y 5 μ l de ADN de *E. canis*; canales 9, 10 y 11: 1, 2 y 5 μ l de ADN de *E. chaffeensis* con cebador HE1 sin calentar; canales 12, 13 y 14: 1, 2 y 5 μ l de ADN de *E. chaffeensis* con cebador HE1 calentado

En este experimento se ensayaron tres volúmenes (1, 2 y 5 μ l) del producto formado en la primera PCR como plantilla de ADN para la segunda amplificación

usando los cebadores ECA o HE1 tal como se obtienen del proveedor (no calentado) o precalentados a 80 °C por dos minutos antes de añadirlos a la mezcla de reacción. Se observó una mejor definición del producto amplificado con el volumen de 1 µl y precalentando los cebadores (Figura 25 A y 25 B, canal 12). También puede observarse que no hubo amplificación cuando se usaron los pares de cebadores ECA/HE3 y HE1/HE3 con el ADN de *E. coli* formado en la primera PCR (Figura 25 A y 25 B, canales 3, 4 y 5). Cuando se utilizó como molde la muestra con ADN de *E. chaffeensis* y los cebadores ECA/HE3, no se observó fragmento amplificado (Figura 25 A, canales 6, 7 y 8); igual ocurrió cuando se realizó la amplificación utilizando como ADN *E. canis* y los cebadores HE1/HE3 (Figura 25 B, canales 6, 7 y 8). Con estos ensayos se demostró la alta especificidad intergénero e interespecie de los cebadores ECA/HE3 y HE1/HE3.

3.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada de las muestras sanguíneas de los perros infectados naturalmente

En la Figura 26 está representada la fotografía de la electroforesis en gel de agarosa, en el cual corrieron los productos de la primera PCR (cebadores ECC/ECB) realizada con 1 µl de ADN extraído de las muestras sanguíneas de los perros diagnosticados con Ehrlichiosis Canina por signos clínicos y FCB. En el canal 13 se puede observar el control positivo correspondiente al ADN de *E. canis* con una banda aproximadamente de 490 pb; en el canal 11 se colocó el control negativo (ADN de células DH82 no infectadas); en el canal 12 agua en lugar de ADN. Las muestras de los productos amplificados con las muestras de ADN de los perros N° 1 al N° 9 se colocaron en los canales 2 al 10. En las muestras correspondientes a los perros N° 1, N° 2; N° 3; N° 5 y N° 8 se visualizan bandas bien definidas iguales al control positivo; en los perros N° 4 y N° 6 se formaron bandas débiles mientras que en los perros N° 7 y N° 9 no hubo formación de productos amplificados. La Figura 27 A y 27 B representa lo mismo que la Figura 26 pero con 10 µl de ADN extraído de las

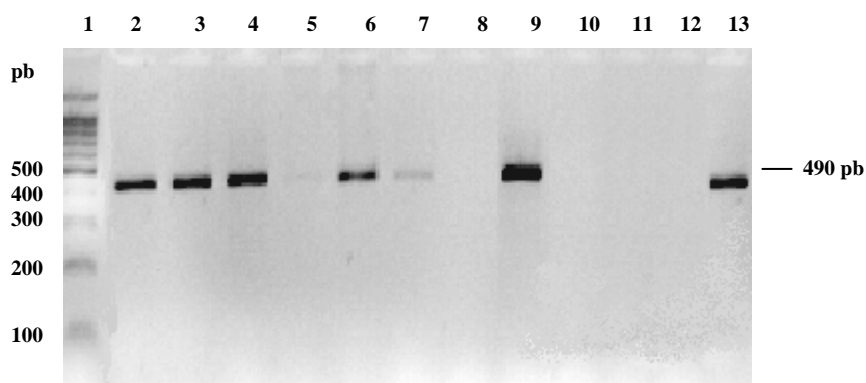


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la primera PCR (cebadores ECC/ECB) utilizando 1 μ l de ADN extraído de las muestras sanguíneas de perros infectados naturalmente. Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pb: pares de bases); canales 2 al 10: perros N° 1 al N° 9; canal 11: control negativo; canal 12: agua; canal 13: control positivo

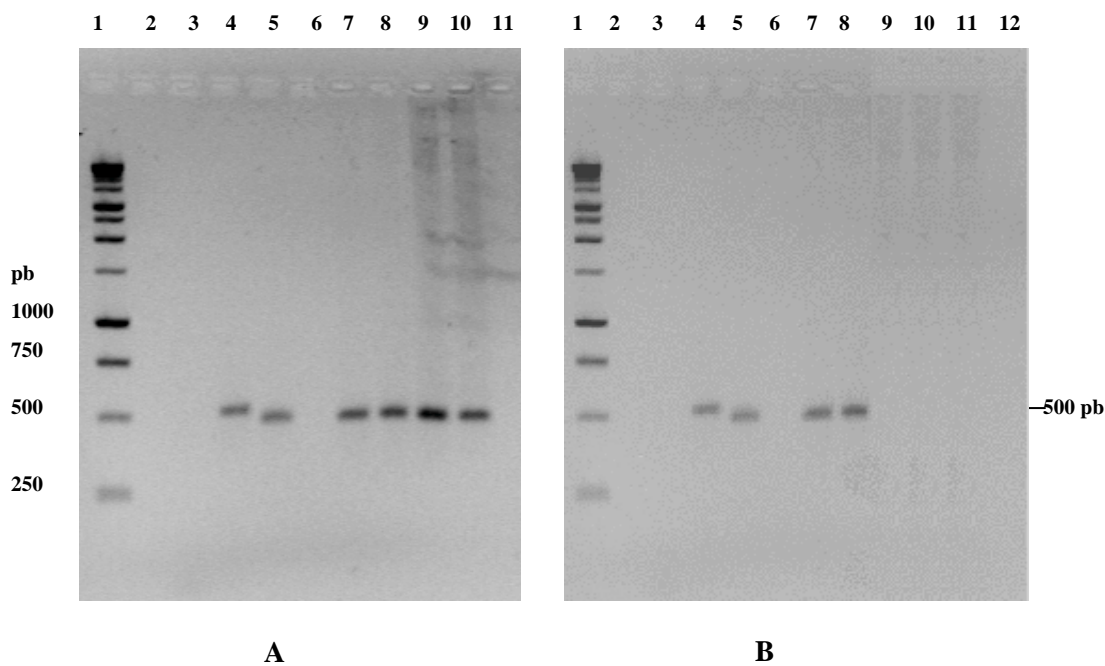


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la primera PCR (cebadores ECC/ECB) utilizando 10 μ l de ADN extraído de las muestras sanguíneas de perros infectados naturalmente. Figura 27 A y 28 B. Canal 1: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de bases); canal 3: control negativo; canal 4: control positivo; canal 5: control positivo. Figura 27 A. Canales 7 al 10: perros N° 1 al N° 4; canal 11: agua. Figura 27 B. Canales 7 al 11: perros N° 5 al N° 9; canal 12: agua

muestras sanguíneas. Los controles están representados de la siguiente manera: control negativo, ADN extraído de células DH82 no infectadas (canal 3 de ambas Figuras); control positivo de un amplificado de otro género bacteriano, ADN de *E.coli* (canal 4 de ambas Figuras) en el que se observa una banda de aproximadamente 510 pb; control positivo, ADN extraído de *E. canis* (canal 5 de ambas Figuras) con una banda de aproximadamente 500 pb; control de los reactivos agua en lugar de ADN (canal 11 en la Figura 27 A y canal 12 en la Figura 27 B). De los 9 perros ensayados en 6 de ellos (canales 7 al 10 de la Figura 27 A, perros N° 1 al N° 4 y canales 7 y 8 de la Figura 27 B, perros N° 5 y N° 6) se visualizó una banda igual a la observada en el control de *E. canis* (resultado positivo), mientras que en tres de los 9 (canales 9, 10 y 11 Figura 27 B, perros N° 7 al N° 9) no se visualizó ninguna banda (resultado negativo).

La Figura 28 representa la corrida electroforética de los productos de la segunda PCR en la cual los productos de la primera PCR (realizada con 1µl de ADN) sirvieron como plantilla de ADN para la segunda, utilizando los cebadores específicos para la especie *E. canis* (ECA/HE3). Los controles y las muestras correspondientes a los perros se colocaron en el mismo orden que están en la Figura 26. Se puede visualizar bandas bien definidas de los productos amplificados en las muestras de los perros N° 1, N° 2, N° 5, N° 6 y N° 8; bandas débiles de los productos amplificados de los perros N° 3 y N° 4; en la muestra concerniente al perro N° 7 no se formó producto amplificado. La Figura 29 es la representación de la corrida electroforética de los productos de la segunda PCR realizada con los productos de la primera PCR (con 10 µl de ADN) utilizando los mismos cebadores anteriores. El control negativo y el de los reactivos fueron los mismos que se utilizaron en la primera PCR y se colocaron en los mismos canales de las Figuras 27 A y 27 B. Se observa que con el producto de *E. coli* no hubo amplificación (canal 4 en ambas Figuras, control negativo de otro género bacteriano). En el canal 5 de ambas figuras se visualiza una banda de aproximadamente 390 a 400 pb correspondiente al ADN de *E. canis*. En los canales 7 al 10 de la Figuras 29 A y 7 al 11 de la Figura 29 B (Figura A: perros N° 1 al N° 4 y

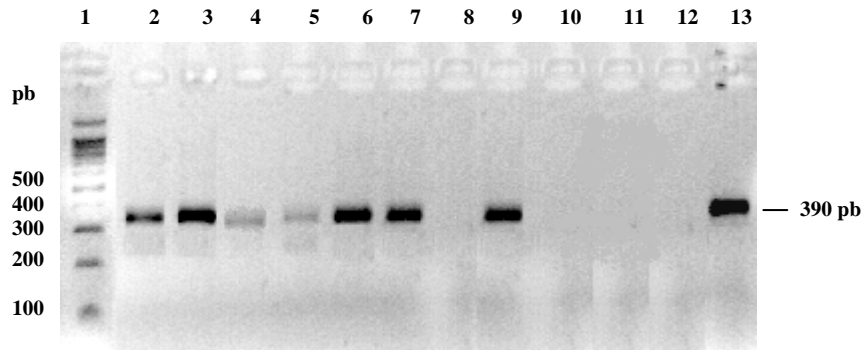


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de la segunda PCR (cebadores ECA/HE3) realizada con los productos de la primera PCR (1 μ l de ADN extraído de muestras sanguíneas). Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pb: pares de bases); canal 2 al 10: perros N° 1 al N° 9; canal 11: control negativo; canal 12: agua; canal 13: control positivo.

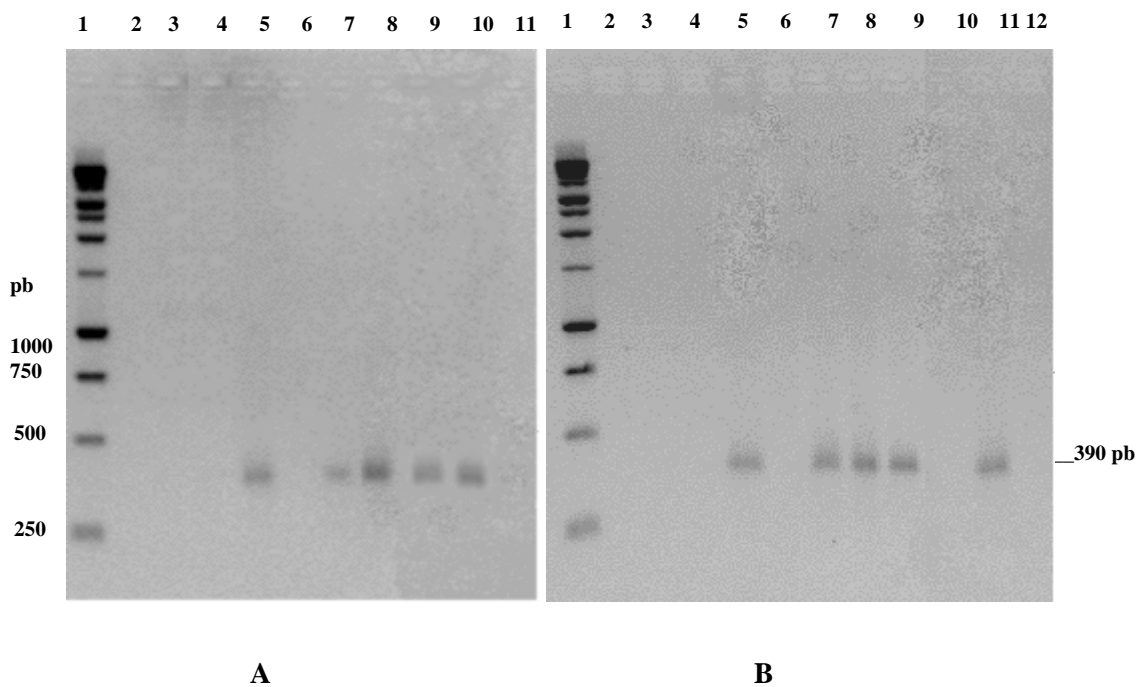


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de la segunda PCR (cebadores ECA/HE3) realizada con los productos de la primera PCR (10 μ l de ADN extraído de muestras sanguíneas). Fig. 30 A y 30 B. Canal 1: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de bases); canal 3: control negativo; canal 4: control negativo; canal 5: control positivo. Fig. 30 A. Canales 7 al 10: perros N° 1 al N° 4; canal 11: agua. Fig. 30 B. Canales 7 al 11: perros N° 5 al N° 9; canal 12: agua.

Figura B: perros N° 5 al N° 9) se formaron amplificadores correspondientes a las muestras de todos los perros ensayados a excepción del perro N° 8 (canal 10, Figura 29 B).

Los productos amplificados en la primera PCR utilizando los cebadores ECB/ECC con 1 µl y 10 µl de ADN también se ensayaron en una segunda PCR con los cebadores HE1/HE3 para la especie *E. chaffeensis*. En la Figura 30 se presenta la fotografía de la corrida electroforética en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR utilizando como plantilla de ADN los productos amplificados en la primera PCR (realizada con 1 µl de ADN extraído de las muestras sanguíneas). En este gel de agarosa se colocó en el canal 13 el control positivo (ADN de *E. chaffeensis*), en el canal 11 el control negativo (ADN de células DH82 no infectadas), canal 12 agua en vez de ADN, en los canales 2 al 10 las muestras de los productos correspondientes a los perros N° 1 al N° 9. Se puede observar que no hubo amplificación con las muestras de los perros, la única banda que se reconoce es la correspondiente al control positivo (canal 13). La fotografía de la corrida electroforética de los productos de la segunda PCR efectuada con los productos de la primera PCR (la cual se llevó a cabo con 10 µl de ADN extraído de las muestras sanguíneas) se puede observar en la Figura 31. Los controles y muestras se colocaron en el mismo orden en que están colocados en la figura del gel anterior. En esta fotografía se puede evidenciar que utilizando los cebadores específicos para *E. chaffeensis* (HE1/HE3) amplificaron los productos de la primera PCR correspondientes a los perros N° 1, N° 2, N° 6 y N° 8 (canales 2, 3, 7 y 9 respectivamente). Los productos de la primera PCR de los perros N° 3, N° 4, N° 5, N° 7 y N° 9 no amplificaron con los cebadores utilizados.

Se obtuvo sangre de un perro infectado naturalmente con signos clínicos de Ehrlichiosis Canina para ser utilizada como inóculo del perro infectado experimentalmente, a partir del cual se obtuvieron los cultivos primarios infectados. En la Figura 32 se observa la electroforesis de los productos de la primera PCR con 1 y 10 µl de ADN extraído de la muestra sanguínea, usando los cebadores ECC y ECB.

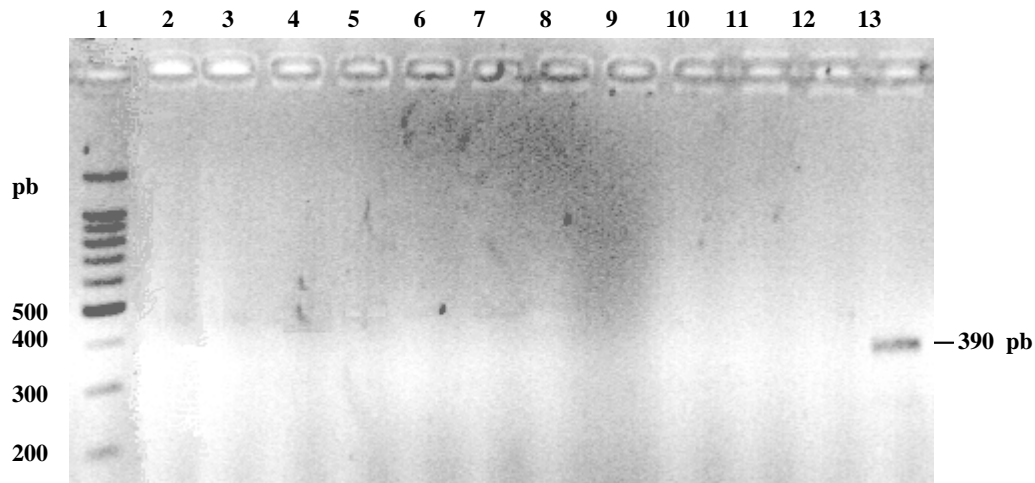


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de la segunda PCR (cebadores HE1/HE3) realizada con los productos de la primera PCR (1 μ l de ADN extraído de muestras sanguíneas de perros infectados naturalmente). Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pb: pares de bases); canal 2 al 10: perros N° 1 al N° 9; canal 11: control negativo; canal 12: agua; canal 13: control positivo.

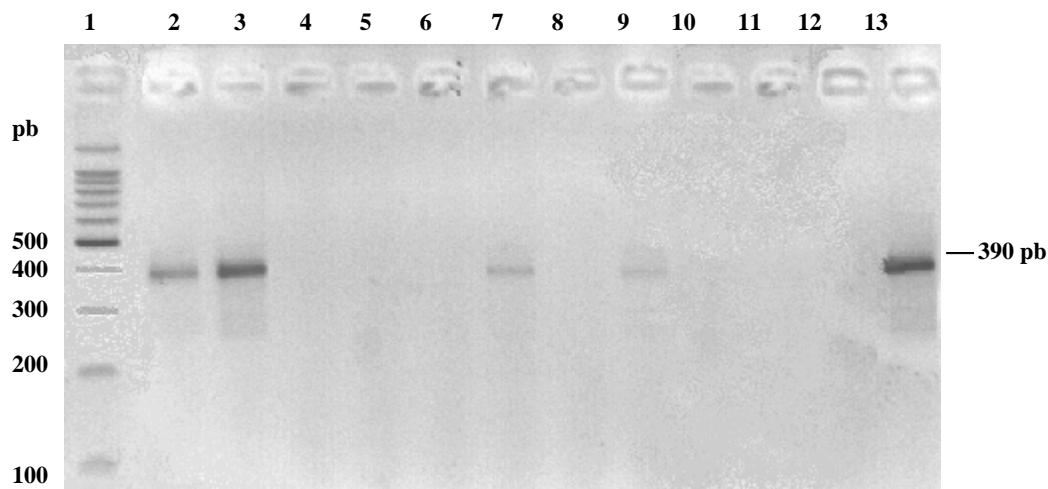


Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de la segunda PCR (cebadores HE1/HE3) realizada con los productos de la primera PCR (10 μ l de ADN extraído de muestras sanguíneas de perros infectados naturalmente). Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pb: pares de bases); canal 2 al 10: perros N° 1 al N° 9; canal 11: control negativo; canal 12: agua; canal 13: control positivo.

En esta PCR se incluyeron los siguientes controles: control de los reactivos, agua en lugar de ADN (canal 3), control negativo, ADN extraído de células DH82 no infectadas (canal 4); control positivo de otro género bacteriano, ADN obtenido de *E. coli* (canal 7); controles positivos, ADN extraído de *E. canis* y *E. chaffeensis* (canales 8 y 9). En esta fotografía se observa con 10 μ l de ADN obtenido de la muestra canina (canal 6) una banda igual a la formada con los controles positivos de aproximadamente 490 pb, con 1 μ l de ADN extraído no hubo formación de banda (canal 5).

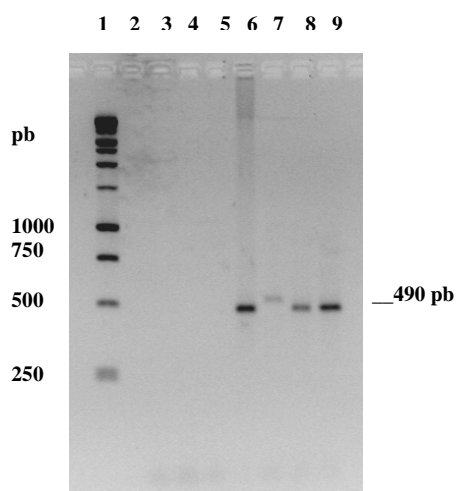


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la primera PCR (cebadores ECC/ECB) realizada con el ADN extraído de la muestra sanguínea del perro utilizado como inóculo. Canal 1: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de bases); canal 3: agua; canal 4: control negativo; canal 5 y 6: 1 μ l y 10 μ l de ADN; canal 7: control positivo (*E. coli*); canal 8 y 9: controles positivos

La Figura 33 es la fotografía de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR. En este caso se utilizó como plantilla de ADN 1 μ l de cada uno de los productos de la PCR anterior y los cebadores para *E. canis* ECA/HE3 (Figura 33 A) y *E. chaffeensis* HE1/HE3 (Figura 33 B). El control de reactivos y negativo fueron los mismos de la PCR anterior y se colocaron en los mismos canales de la Figura 32. Como puede observarse en el canal 7 de las Figuras 33 A y 33 B no

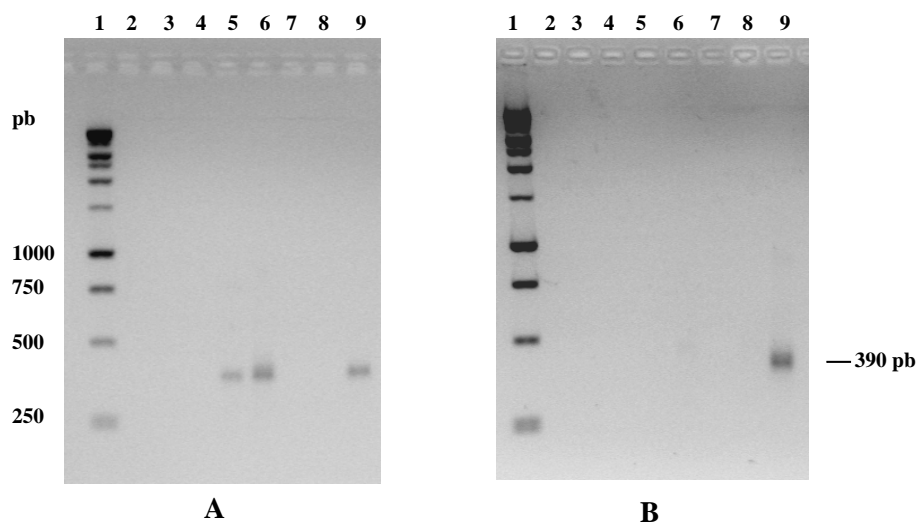


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR (cebadores de especie) realizada con los productos de la primera PCR (ADN del perro utilizado como inóculo). Figura 33 A y 33 B (cebadores ECA/HE3 y HE1/HE3 respectivamente). Canal 1: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de bases); canal 3: agua; canal 4: control negativo, canal 5 y 6: 1 μ l y 10 μ l de ADN del perro; canal 7: control negativo. Figura 33 A (cebadores ECA/HE3). Canal 8: control negativo; canal 9: control positivo. Figura 33 B (cebadores HE1/HE3). Canal 8: control negativo; canal 9: control positivo

se formaron bandas con el producto del ADN extraído de *E. coli* (control negativo). En el canal 8 de la Figura 33 A no hubo amplificación a partir del producto formado con ADN extraído de *E. chaffeensis* utilizando los cebadores específicos para la especie *E. canis*, ECA/HE1 (control negativo) y lo mismo ocurrió en el canal 8 de la Figura 33 B con el producto formado con ADN extraído de *E. canis* utilizando los cebadores específicos para la especie *E. chaffeensis* HE1/HE3 (control negativo). En el canal 5 y 6 de la Figura 33 A se visualizan dos bandas tanto con el producto correspondiente a 1 μ l como con 10 μ l de ADN extraído de la muestra canina de 380 a 400 pb igual a la observada en el control positivo (canal 9), mientras que en la Figura 33 B la única banda formada es la del control positivo (canal 9, ADN extraído de *E. chaffeensis*).

3.5 PCR anidada del perro inoculado experimentalmente y de los cultivos primarios obtenidos de este perro

Las Figuras 34 y 35 muestran la corrida electroforética de la primera y segunda ronda de PCR (cebadores ECB/ECC y ECA/HE3 respectivamente) con las muestras de ADN del perro inoculado experimentalmente. En la primera PCR los controles utilizados estuvieron conformados por uno negativo, obtenido a partir del ADN de células DH82 sin infectar (canal 3); dos controles positivos correspondientes al ADN de *E. coli* y ADN de *E. canis* (canales 4 y 5 respectivamente), los cuales pueden visualizarse como bandas de 510 pb para el control de *E. coli* y entre 480-500 pb para *E. canis*.

Los productos amplificados en la primera PCR con el ADN de células DH82 sin infectar, ADN de *E. coli* y ADN de *E. chaffeensis* se emplearon como controles negativos de la segunda ronda de PCR (Figura 35, canales 3, 4 y 5 respectivamente); el producto de la primera PCR con el ADN de *E. canis* sirvió como control positivo (Figura 35, canal 6) y se evidencia como una banda de aproximadamente 390 pb. En la Figura 34 (primera PCR) se pueden visualizar bandas ligeras de aproximadamente 500 pb en los canales 11, 12 y 15 correspondientes a los días PI 14, 17 y 32 PI, mientras que en la Figura 35 (segunda PCR) se observan bandas muy ligeras de 400 pb el día de la inoculación (día 0, canal 7), 43 PI (canal 17) y el día 73 PI (canal 19, 23 días después de iniciado el tratamiento). En esta misma Figura se observa como paulatinamente va aumentando la intensidad de las bandas en los días 10, 14, 17, 19 y 23 PI (canales 8, 9, 13, 14 y 15).

La segunda ronda de PCR se realizó utilizando los cebadores específicos para la especie *E. chaffeensis* (HE1/HE3) y los productos amplificados en la primera PCR correspondientes al control negativo (células DH82 no infectadas, canal 6), control positivo (*E. chaffeensis*, canal 7) y las muestras de los días 0, 10, 14 y 17 PI (canales

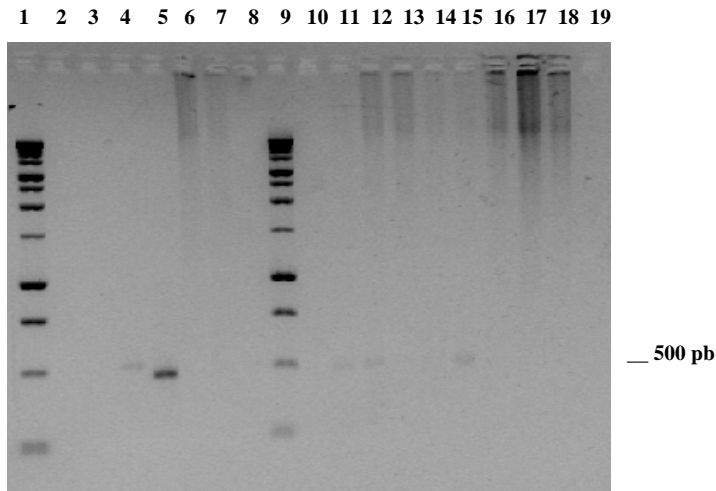


Figura 34. Electroforesis de los productos de la primera PCR (cebadores ECC/ECB) realizada con 10 μ l de ADN extraído de las muestras sanguíneas del perro inoculado experimentalmente. Canal 1 y 9: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de base); canal 3: control negativo; canal 4: control positivo (*E. coli*); canal 5: control positivo; canal 6: día 0 de la inoculación experimental; canal 7 día 10 PI; canal 11: día 14 PI; canal 12: día 17 PI; canal 13: día 19 PI; canal 14: día 23 PI; canal 15: día 32 PI; canal 16: día 43 PI; canal 17: día 50 PI; canal 18: día 73 PI; canal 19: agua

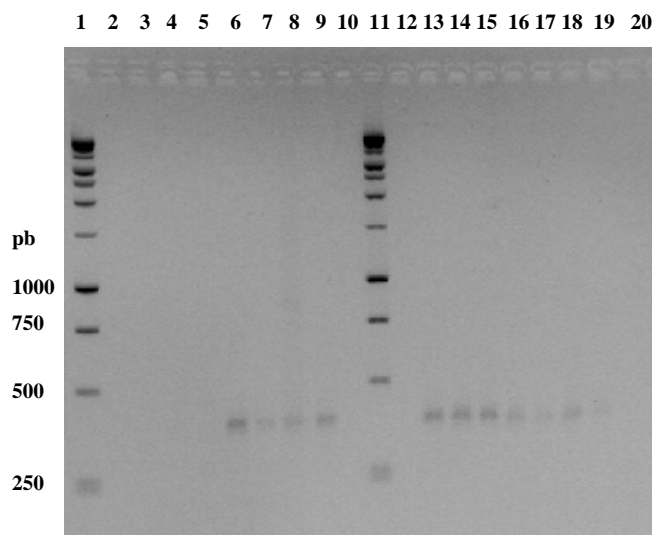


Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR (cebadores: ECA/HE3) del perro inoculado experimentalmente. Canal 1 y 11: marcador de peso molecular de 1 Kb (pares de base); canal 3: control negativo; canal 4: control negativo; canal 5: control negativo; canal 6: control positivo; canal 7: día 0 de la inoculación experimental; canal 8: día 10 PI; canal 9: día 14 PI; canal 13: día 17 PI; canal 14: día 19 PI; canal 15: día 23 PI; canal 16: día 32 PI; canal 17: día 43 PI; canal 18: día 50 PI; canal 19: día 73 PI; canal 20: agua

2, 3, 4 y 5); después que se llevó a cabo la PCR hubo amplificación en el control positivo y en las muestras, lo que se evidenció como bandas de aproximadamente 390 pb en el gel utilizado para la corrida electroforética (Figura 36).

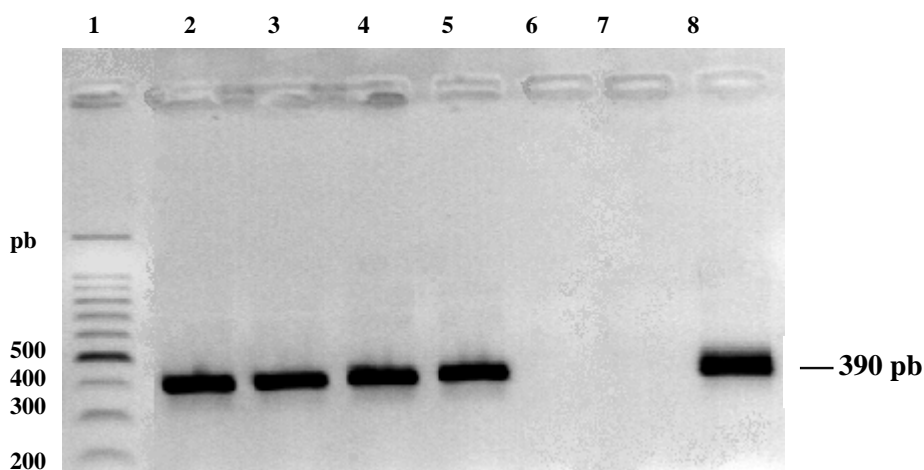


Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR (cebadores: HE1/HE3) del perro inoculado experimentalmente. Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pares de base); canal 2: día 0 de la inoculación experimental; canal 3: día 10 PI; canal 4: día 14 PI; canal 5: día 17 PI; canal 6: control negativo; canal 7: agua; canal 8: control positivo

De este perro infectado experimentalmente se obtuvieron cultivos primarios. Se extrajo el ADN de las alícuotas almacenadas a -70°C de los cultivos primarios infectados número 1 (día 14 después de haber sido sembrado), número 2 (día doce después de realizar el primer pase), número 3 (sobrenadante a los seis días de haber realizado el segundo pase), número 4 (día 15 después de realizar el tercer pase). La Figura 37 representa la electroforesis en gel de agarosa de los productos formados en la primera PCR utilizando los cebadores de género ECC y ECB. Se puede observar una banda entre 490 a 500 pb con el ADN *E. chaffeensis* y *E. canis* utilizados como controles positivos del género *Ehrlichia* (canales 3 y 4 respectivamente). Se evidencian bandas de aproximadamente 490 a 500 pb con 10 μl de ADN del cultivo N° 1 y cultivo N° 2 (canales 7 y 9, respectivamente). Con 1 y 10 μl de ADN del sobrenadante del cultivo N° 3 no hubo amplificación (canales 10 y 11), mientras que

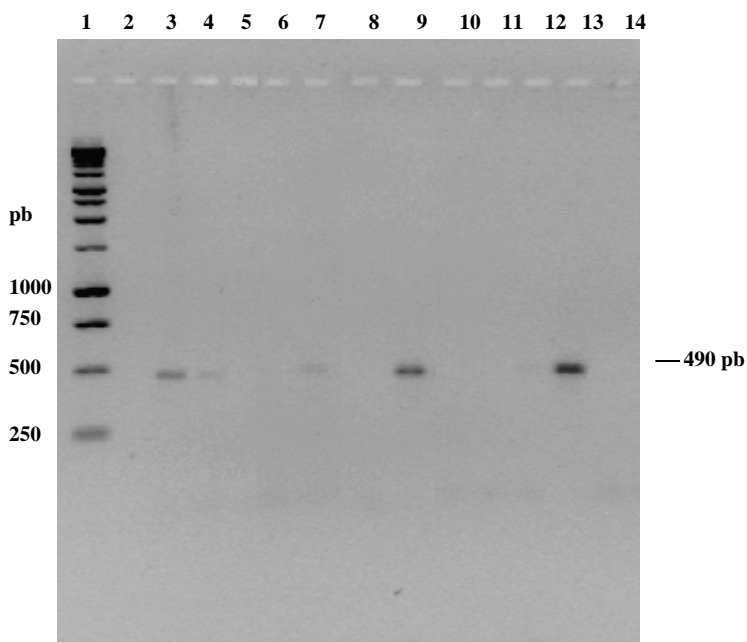


Figura 37. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la primera PCR de los cultivos primarios infectados (cebadores ECC/ECB). Canal 1: marcador de peso molecular de 1 Kb (pb: pares de base); canal 3: control positivo (*E. chaffeensis*); canal 4: control positivo (*E. canis*); canal 5: control negativo (ADN de células DH82 sin infectar); canales 6 y 7: 1 y 10 µl ADN del cultivo primario N° 1; canales 8 y 9: 1 y 10 µl ADN del cultivo primario N° 2; canales 10 y 11: 1 y 10 µl ADN del cultivo primario N° 3 (sobrenadante); canales 12 y 13: 1 y 10 µl ADN del cultivo primario N° 4; canal N° 14: agua

con 1 y 10 µl de ADN del cultivo N° 4 se formó una banda intensa con 10 µl (canal 13).

Luego se llevó a cabo la segunda ronda de PCR con los cebadores específicos ECA/HE3 (Figura 38, *E. canis*) y HE1/HE3 (Figura 39, *E. chaffeensis*). En ambos casos se utilizaron 1 µl de los productos de la primera PCR realizada con 10 µl de ADN de las muestras de los cultivos primarios N° 1, N° 2 y N° 3. Se incluyó un control negativo (producto de la primera PCR llevada a cabo con el ADN de las células DH82 no infectadas, canal 5 de las dos Figuras) y un control positivo (producto de la primera PCR efectuada con el ADN de *E. canis*, canal 7 de la Figura 38 y *E. chaffeensis* canal 7 de la Figura 39). En las dos Figuras se puede observar que después de realizada la segunda PCR y corrido los productos en el gel, amplificaron

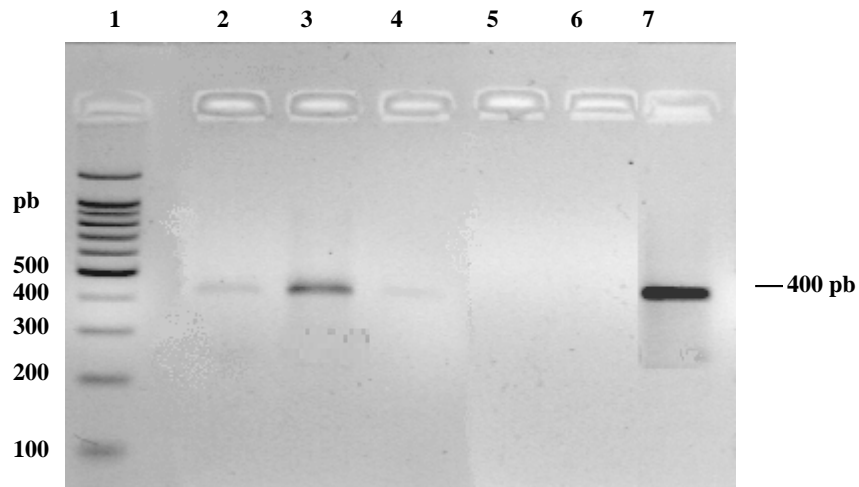


Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR con los cultivos primarios (cebadores ECA/HE3). Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pares de base); canales 2 al 4: cultivos primarios N° 1, N° 2 y N° 3; canal 5: control negativo; canal 6: agua; canal 7: control positivo

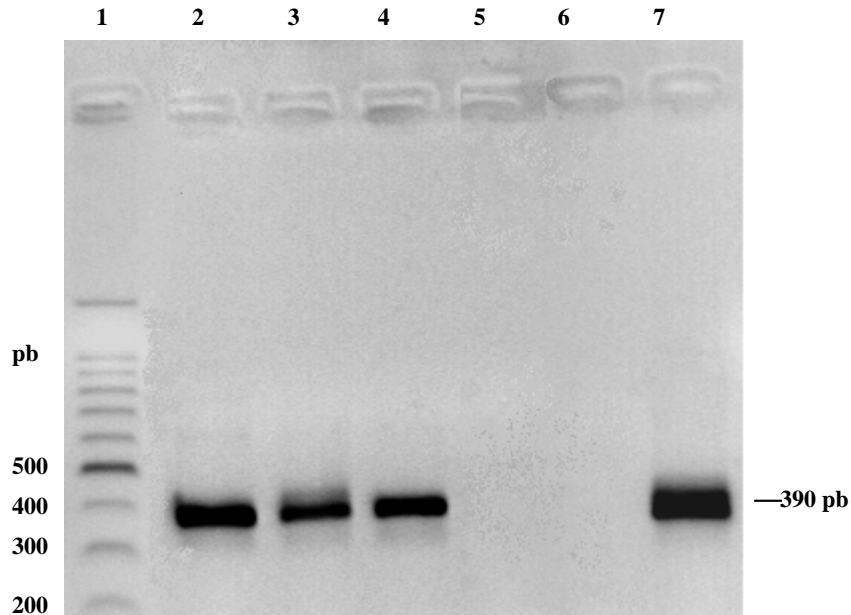


Figura 39. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR con los cultivos primarios (cebadores HE1/HE3). Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pares de base); canales 2 al 4: cultivos primarios N° 1, N° 2 y N° 3; canal 5: control negativo; canal 6: agua; canal 7: control positivo

las muestras correspondientes al control positivo y las muestras de los cultivos; esto se evidencia en el gel como bandas de aproximadamente 390 pb.

3.6 PCR del perro inoculado con los cultivos primarios de monocitos infectados

A la perra inoculada con los cultivos primarios se le extrajo sangre antes de la inoculación (día 0) y a los días 6, 9, 14, 18, 21, 26, 46 y 64 días PI. Estas muestras se almacenaron a -70°C y luego se descongelaron con la finalidad de extraerles el ADN y realizar la primera ronda de PCR con los cebadores ECC y ECB cuyos resultados se muestran en la Figura 40. Se puede observar una banda de aproximadamente 510 pb con el ADN de *E. coli* utilizado como control positivo (canal 4), una banda de 500 pb con el control positivo del género *Ehrlichia* (ADN de *E. canis*, canal 5). Con respecto a las muestras de ADN (10 μl) analizadas del animal inoculado se puede evidenciar que se formaron productos representados por bandas de 500 pb iguales a las del control positivo a los días 9, 14, 18 y 25 PI, siendo esta última muy tenue (canales 8, 9, 10 y 12).

La segunda ronda de PCR se efectuó con los productos de la primera PCR realizada con el control negativo (células DH82 sin infectar, canal 10 de la Figura 41 y Figura 42 respectivamente) y los productos de la primera PCR efectuada con 10 μl del ADN de las muestras correspondientes a los días 0, 6, 14, 18, 21, 26, 46 y 64 PI. Esta PCR se realizó utilizando los cebadores para la especie *E. canis* (ECA/HE3, Figura 41) y *E. chaffeensis* (HE1/HE3, Figura 42). En los canales 3, 7 y 8 de la Figura 41 se observan bandas tenues de aproximadamente 390 pb correspondientes a los días 6, 25 y 46 PI. También se evidencian bandas bien definidas en los canales 4, 5 y 6 pertenecientes a los días 14, 18 y 21 PI iguales a la observada en el control positivo. En el gel representado en la Figura 42 todas las bandas observadas son bien definidas y corresponden al control positivo y a los días 6, 14, 18, 21 y 25 PI (canales 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente).

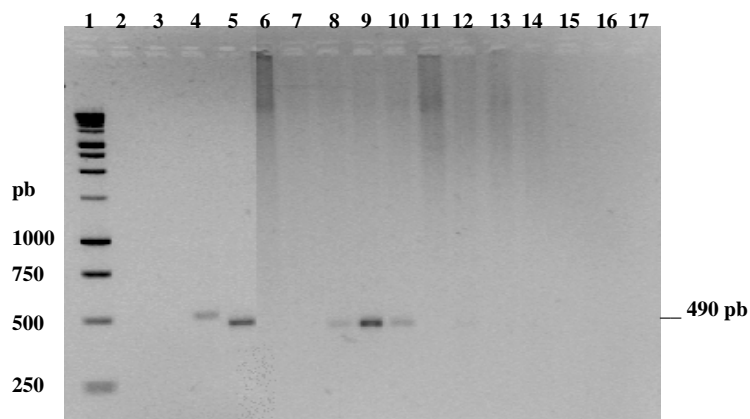


Figura 40. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la primera PCR (cebadores ECC/ECB) del perro inoculado experimentalmente utilizando como inóculo cultivos primarios. Canal 1: marcadores de peso molecular (pb: pares de base); canal 3: control negativo (ADN de células DH82); canal 4: control positivo; canal 5: control positivo; canal 6: día 0 de la inoculación experimental; canal 7 al 14: día 6, 9, 14, 18, 21, 25, 46 y 64 PI; canal 15: agua

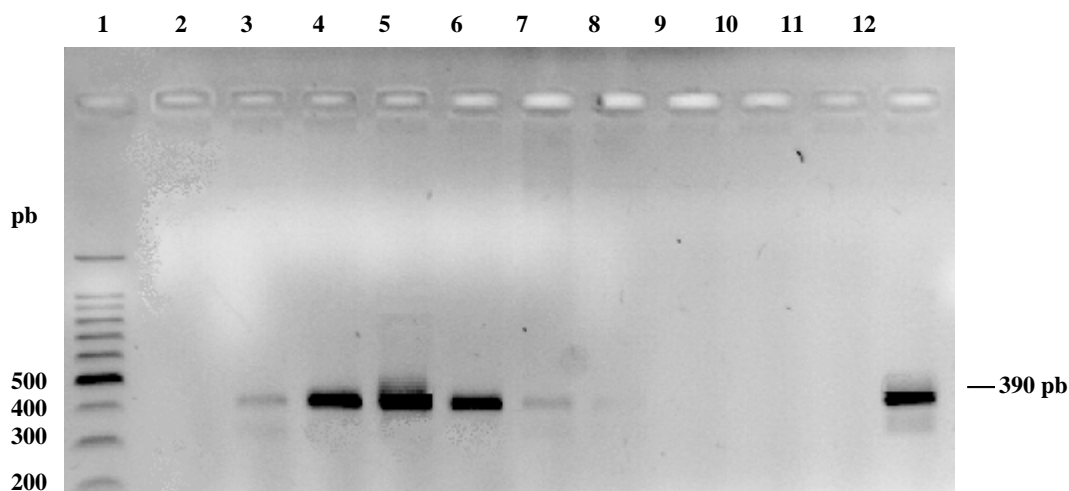


Figura 41. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR (cebadores: ECA/HE3) del perro inoculado experimentalmente con los cultivos primarios. Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pares de base); canal 2: día 0 de la inoculación experimental; canal 3: día 6 PI; canal 4: día 14 PI; canal 5: día 18 PI; canal 6: día 21 PI; canal 7: día 25 PI; canal 8: día 46 PI; canal 9: día 64 PI; canal 10: control negativo; canal 11: agua; canal 12: control positivo

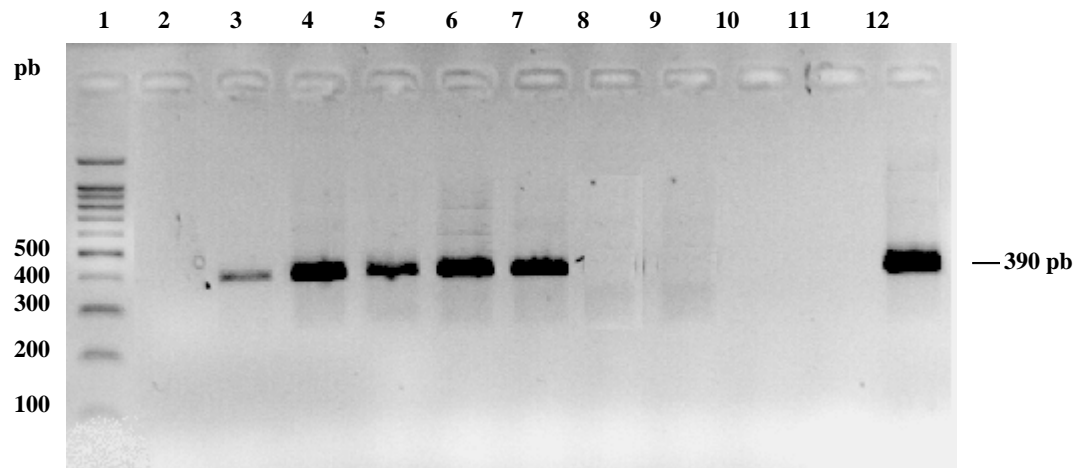


Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda PCR (cebadores: HE1/HE3) del perro inoculado experimentalmente con los cultivos primarios. Canal 1: marcador de peso molecular de 100 pb (pares de base); canal 2: día 0 de la inoculación experimental; canal 3: día 6 PI; canal 4: día 14 PI; canal 5: día 18 PI; canal 6: día 21 PI; canal 7: día 25 PI; canal 8: día 46 PI; canal 9: día 64 PI; canal 10: control negativo; canal: 11: agua; canal 12: control positivo

V. DISCUSIÓN

La Ehrlichiosis Canina es una enfermedad infecciosa producida por organismos Rickettsiales intracelulares obligatorios, transmitida por garrapatas entre miembros de la familia *Canidae*. Hay varias especies que infectan los leucocitos sanguíneos y las plaquetas del perro, entre las que se pueden mencionar: *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. risticii* (*Neorickettsia risticii*), *E. equi* (*Anaplasma phagocytophila*) y *E. platys* (*Anaplasma platys*). En algunos casos no se evidencia clínica pero en otros puede variar de leve a severa e incluso el animal puede morir debido a esta enfermedad (Huxsoll *et al.*, 1970; Conrad, 1989; Kakoma *et al.*, 1994; Dawson *et al.*, 1996a; Breitschwerd *et al.*, 1998).

Desde que la enfermedad y el agente etiológico se observaron por primera vez en perros de Argelia en el año de 1935, ha sido reconocida en casi todos los países del mundo, sobre todo en regiones tropicales y subtropicales (McDade, 1990). Venezuela por ser un país tropical y donde habita la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus*, vector de *E. canis*, reúne las condiciones apropiadas para que esté presente tanto la infección como la enfermedad, así lo han demostrado diferentes estudios publicados desde 1992 (Arraga-Alvarado, 1992; García *et al.*, 1992; García *et al.*, 1999; Tamí *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1996; Gutiérrez *et al.*, 1999; Unver *et al.*, 2001; Suksawat, 2001a).

Cuando se empezó a estudiar esta enfermedad, las Ehrlichias Monocíticas Caninas eran mantenidas *in vivo* en el laboratorio a través de pasajes seriados en perros, ya que los ratones, ratas, cobayos y hámsteres demostraron ser resistentes a la infección. Se hicieron ensayos para propagar la bacteria en huevos embrionados de

pollo pero estos intentos fracasaron (Huxsoll *et al.*, 1970). Luego se lograron establecer cultivos *in vitro*, al principio eran primarios obtenidos de sangre de perros enfermos y años más tarde se utilizaron líneas celulares continuas, con la ventaja de que estos últimos cultivos se pueden mantener en el laboratorio por tiempo indefinido y se obtienen porcentajes altos de células infectadas (Nyindo *et al.*, 1971; Dawson *et al.*, 1991b).

Uno de los propósitos principales de esta investigación era el aislamiento de Ehrlichia Monocítica Canina *in vitro* en la línea celular continua DH82, la cual se adquirió comercialmente de la American Type Collection Culture (ATCC). El establecimiento de la línea celular fue necesario, ya que es el único sistema que permite el aislamiento de la bacteria *in vitro*. Se escogió esta línea celular porque la conforman macrófagos de origen canino y además existen reportes de aislamiento tanto de *E. canis* como de *E. chaffeensis* en estas células (Dawson *et al.*, 1991a; Dawson *et al.*, 1991b; Dumler *et al.*, 1995). Para conocer sus características de crecimiento se realizó una curva de crecimiento, la cual se inició con 3×10^6 células por frasco de cultivo en el día 0, inóculo recomendado por la ATCC.

Cuando Wellman *et al.* (1988) establecieron por primera vez esta línea celular realizaron una curva de crecimiento comenzando en el día cero (0) con 1×10^6 células totales en cada frasco de cultivo. Cuando se compararon las dos curvas, a pesar de que los investigadores del primer estudio utilizaron tres veces menos células que en el presente trabajo, no se observaron diferencias con relación al período de la fase logarítmica y se observaron pocas diferencias con respecto a la fase estacionaria y período de duplicación de la población celular, esto indica que aún cuando la línea fue establecida hace más de diez años, el tiempo de generación o de división celular se ha mantenido igual. Una de las diferencias observadas entre ambas curvas es con respecto al contaje celular máximo; mientras que en el primer trabajo se alcanzó un máximo de $2,5 \times 10^6$ células totales, en este estudio se obtuvo un máximo de $6,8 \times 10^6$ células. Es posible que esta diferencia se deba a que la curva reportada en el

trabajo original se realizó cuando se habían hecho pocos pases de la línea celular, estas células estaban empezando a adaptarse al cultivo *in vitro*, mientras que la curva obtenida con este estudio se realizó con células que ya tenían más de diez años de cultivadas *in vitro*. Posiblemente esta puede ser la razón por la cual en los cultivos del primer trabajo no se describe la formación de grupos celulares parecidos a racimos de células que sobresalen de la superficie de la monocapa celular observados por nosotros en la fase estacionaria.

Con relación a la crioconservación de las células, logramos optimizar las condiciones en cuanto a concentración celular y medio conservador utilizado. Inicialmente se siguieron las condiciones recomendadas por la ATCC como son: concentración celular de 5×10^6 células/ml en el medio conservador A (5 % DMSO, 15 % SFB y 80 % MEM base), pero en ese medio no se mantuvieron de manera óptima las células, ya que cuando se descongelaron células almacenadas por tres meses en nitrógeno líquido, mostraban una viabilidad celular entre el 60 % y el 70%. Por este motivo, se hicieron otros ensayos debido a que se recomienda la utilización de medios conservadores que den como resultado viabilidades celulares mayores o iguales al 85 % con células que se han almacenado durante años en nitrógeno líquido (Harlow y Lane, 1988). Al utilizar el medio conservador C (5% DMSO, 45 % SFB y 50 % MEM base) con la concentración celular $2,5 \times 10^6$ células/ml, se observó que el porcentaje de viabilidad era igual o mayor al 90 % para células almacenadas hasta por seis meses en nitrógeno líquido. Es importante continuar evaluando la viabilidad de las células que estén almacenadas por períodos de tiempo superiores a los seis meses, para determinar la capacidad de crioconservación de este medio.

Durante el desarrollo de este trabajo se realizó un pequeño estudio serológico con trece perros, con la finalidad de seleccionar un suero con un alto título de anticuerpos (Acs) anti-Ehrlichia Monocítica Canina. El suero elegido, se utilizó para preparar el conjugado requerido en la prueba Inmunofluorescencia Directa (IFD). Con este conjugado se pudo determinar el porcentaje de células infectadas de los cultivos

DH82 y de los cultivos primarios. La serología de los trece perros se realizó utilizando como antígeno (Ag) *E. canis* mediante el ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). La IFI se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Ristic *et al.* (1972), quienes recomiendan una dilución 1/10 del suero para la prueba cualitativa. Sin embargo, cuando se ensayaron diferentes diluciones tanto del suero control negativo como del positivo para la estandarización del ensayo, observamos que con la dilución 1/10 se visualizaba fluorescencia inespecífica en el sustrato antigénico con ambos controles y que a partir de la dilución 1/40 no se evidenciaba fluorescencia inespecífica, quedando establecida esta dilución para la realización de la determinación cualitativa.

Después de realizada la prueba de IFI con los trece sueros caninos se determinó que 84,6 % reaccionaban con el Ag de *E. canis*, con lo que se demostró que estos perros habían estado en contacto con *E. canis* o alguna otra especie relacionada antigénicamente. Estos animales, de acuerdo a lo expresado por sus dueños, en algún momento habían estado infestados por garrapatas. Aunque no precisaron la especie de garrapata, es muy probable que haya sido *R. sanguineus*, vector de *E. canis*, ectoparásito ampliamente distribuido en todo el territorio nacional, encontrándose parasitando caninos en los más variados ambientes (Coronado y Mujica, 1998).

Aunque con este pequeño estudio no se pretendía establecer una prevalencia, existen otros trabajos en los cuales se evalúa un mayor número de perros que reportan porcentajes de seropositividad semejantes al presentado en esta investigación. Uno de los más recientes es el reportado por Suksawat *et al.* (2001b) con 49 sueros caninos evaluados en Tailandia, en los que se demostraron Acs contra *E. canis* en el 71 %. Martínez y Gutiérrez (2000) examinaron 110 muestras de sueros de perros aparentemente sanos de la población de Zuata, estado Aragua, y detectaron Acs anti-*E. canis* en 77,3% de las muestras. Otro estudio más extenso (Ghorbel *et al.*, 1994) en el que se analizaron 1.216 sueros caninos de varias regiones de Tunicia (África),

reveló una prevalencia del 49 % en la capital del país mientras que en otras regiones la prevalencia varió entre 75 % y 85 %.

Para realizar el aislamiento de Ehrlichia Monocítica Canina se seleccionaron nueve perros con signos clínicos de Ehrlichiosis Canina y Frotis de Capa Blanca (FCB) con inclusiones intracitoplasmáticas basófilas en células mononucleares. Las características morfológicas de las inclusiones observadas en estos frotis coincidieron con las descritas en otras investigaciones (Huxsoll *et al.*, 1970; Huxsoll *et al.*, 1972; Arraga-Alvarado 1992; Harrus *et al.*, 1998; Gutiérrez *et al.*, 1999).

Cuando se analizaron los datos hematológicos de los nueve animales se encontró que todos presentaron anemia y trombocitopenia. Kuehn y Gaunt (1985), en un estudio retrospectivo realizado con 56 perros con signos clínicos de Ehrlichiosis Canina procedentes de Luisiana (Estados Unidos), también encontraron estas variaciones hematológicas, reportando anemia en 72 % y trombocitopenia en 64 % de los perros. Más recientemente, Kordick *et al.* (1999), reportan 59 % de anemia y 78 % de trombocitopenia en una investigación realizada en 27 perros enfermos de una perrera de Carolina del Norte (Estados Unidos). La divergencia entre los valores porcentuales de los dos estudios y el nuestro, puede deberse a la diferencia en el grado de virulencia de cepas en regiones geográficas distintas, tal como se sugiere en el estudio realizado por Kuehn y Gaunt (1985). Sería conveniente realizar una investigación con un número mayor de perros con signos clínicos de Ehrlichiosis Canina en el área geográfica del estado Aragua utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como método de laboratorio, incluyendo entre las variables los parámetros hematológicos.

Con relación al recuento de leucocitos, observamos leucopenia en solo dos de los perros (22,2 %) mientras que el resto de ellos mantenían valores normales. El porcentaje encontrado en esta investigación es muy semejante al reportado por Kuehn y Gaunt (1985) quienes señalan que 25 % de los animales analizados mostraban

leucopenia mientras que el 61 % tenía un conteaje dentro de los valores de referencia y el 14 % presentó leucocitosis.

El estudio por Microscopia Electrónica de Transmisión confirmó que las mórulas observadas en los FCB correspondían a bacterias pertenecientes al género *Ehrlichia*. Los hallazgos que permiten hacer esta afirmación están fundamentados en la observación de vacuolas citoplasmáticas dentro de células mononucleares donde se visualizan cuerpos elementales ovoides rodeados por una doble membrana: una interna que se corresponde con la membrana plasmática bacteriana y otra ondulada externa separada de la membrana interna por el espacio periplásmico; esta doble membrana representa uno de los detalles ultraestructurales más importantes en la identificación de las bacterias Gram negativas y por lo tanto de las Ehrlichias como lo describen muchos autores (Simpson, 1972; Hildebrandt *et al.*, 1973; Madigan *et al.*, 1997; Popov *et al.*, 1995; Popov *et al.*, 1998; Gutiérrez *et al.*, 1999). El trío: célula mononuclear-vacuola intracitoplasmática-cuerpo elemental permite ubicar a los microorganismos hallados en esta investigación dentro del grupo Ehrlichia Monocítica, ya que exhiben las características ultraestructurales mencionadas (Figura 21).

Las células mononucleares o los leucocitos infectados, de los animales seleccionados, se sembraron directamente en la línea celular DH82 y el porcentaje de células infectadas de los cultivos, se evaluó hasta el día 60 postinfección. Muchos fueron los intentos realizados para encontrar células infectadas, sin embargo no observamos las inclusiones basófilas o fluorescentes características (cuando se realizó coloración de Giemsa o Inmunofluorescencia Directa) reportadas en diferentes trabajos relacionados con el aislamiento de estos microorganismos, utilizando esta misma metodología y línea celular (Dawson y Ewing, 1992; Dawson *et al.*, 1994; Iqbal *et al.*, 1994; Lockhart *et al.*, 1997). Tal vez, el tratamiento de la sangre canina con Ficoll/Hypaque o buffer de lisis influyó en la viabilidad de los microorganismos Ehrlichiales y éstos perdieron la capacidad para infectar las células DH82. Existen

publicaciones como la de Dawson *et al.* (1996b), quienes manifiestan el fracaso del aislamiento de *Ehrlichia* sp. a partir de venados infectados naturalmente; esto no es sorprendente, ya que las Ehrlichias son consideradas microorganismos de difícil cultivo porque son bacterias intracelulares obligatorias que hasta ahora no han podido ser cultivadas en medios libres de células y requieren condiciones de crecimiento muy exigentes (Dawson *et al.*, 1991a; Rikihisa, 1991; Walker y Dumler, 1996).

Otra metodología que utilizamos para el aislamiento de Ehrlichia Monocítica Canina fue a través de cultivos primarios de monocitos *in vitro*, obtenidos de la sangre infectada de un perro inoculado experimentalmente. Las primeras inclusiones intracitoplasmáticas se observaron al noveno día postinfección (PI), tanto por coloración de Giemsa como por IFD. En algunas células se visualizaron únicamente cuerpos iniciales, en otras mórulas y en algunas había una mezcla de cuerpos elementales, cuerpos iniciales y mórulas (Figura 12); estas últimas células también fueron descritas por Ristic *et al.* (1972) y Weisiger *et al.* (1975) en sus investigaciones. Los cuerpos elementales por ser las formas evolutivas de menor tamaño (0,5 μm - 08 μm) no se observaron en la coloración de Giemsa sino por IFD. Nyindo *et al.* (1971) describen de forma diferente a la nuestra, la evolución de los cultivos primarios establecidos en su investigación; estos autores refieren en orden cronológico la aparición de las diferentes formas evolutivas de la siguiente manera: a las 48 horas PI observaron los cuerpos elementales, entre dos a tres días PI los cuerpos iniciales y finalmente de 7 a 12 días PI las mórulas.

En nuestro estudio se determinó que entre los nueve y 14 días del cultivo inicial, las células infectadas tenían pocas inclusiones intracitoplasmáticas (Figura 11 y Figura 13 A, B, C, D y E), mientras que Nyindo *et al.* (1971) describen células hasta con 70 mórulas a los 14 días de sembrados los cultivos; nosotros observamos células con este número de mórulas a los 14-15 días del segundo o tercer pase de los cultivos (Figuras 13 F y Figura 14 A). En cambio Hemelt *et al.* (1980), de forma semejante a la nuestra, relatan en su estudio, la visualización de células con una o más inclusiones

a los 5 días PI y luego el número de estas inclusiones por célula aumentaron con los pases celulares.

En relación al porcentaje de células infectadas, nosotros evidenciamos entre 7% y 19% de células infectadas a los 14-15 días de los cultivos iniciales. Esto difiere de lo encontrado por Ristic *et al.* (1972), quienes reportan entre 25 % y 40 % de células infectadas. En otros estudios se refiere la obtención de 30 % de células infectadas al séptimo día PI (Keysary *et al.*, 1996), lo cual es semejante a lo publicado por Hemelt *et al.* (1980) quienes lograron el mismo rendimiento pero al décimo día PI. En este estudio, altos porcentajes de células infectadas (60 %) los observamos a los 14-15 días del tercer pase muy semejantes a los porcentajes encontrados en este mismo pase por Hemelt *et al.* (1980). Todas estas diferencias y similitudes con relación al número de inclusiones intracitoplasmáticas por célula y porcentaje de células infectadas en los cultivos iniciales sugieren que estas dos variables pudieran depender en parte, de la carga bacteriana viable del animal a partir del cual se obtienen los cultivos primarios.

Cabe destacar que: la similitud encontrada cuando comparamos con otros trabajos las características morfológicas de las inclusiones intracitoplasmáticas, el aumento progresivo en el porcentaje de células infectadas y número de inclusiones por células relacionados con el tiempo del cultivo y pases celulares, nos permiten afirmar que en la presente investigación se aisló en los cultivos primarios Ehrlichia Monocítica Canina a partir de la sangre infectada de un perro inoculado experimentalmente.

De manera semejante a como se realizó en otros estudios (Dawson *et al.*, 1991b; Keysary *et al.*, 1996), intentamos adaptar los cultivos primarios a la línea celular DH82, pero nuestros intentos fracasaron. Sin embargo, con esta metodología se pudo demostrar que los microorganismos tenían capacidad infectante, ya que después de inocular con los cultivos primarios a un perro Pastor Alemán sano, el

animal mostró cambios clínicos y hematológicos compatibles con Ehrlichiosis Canina. Más aún, antes de la inoculación el animal no presentaba Acs anti-*E. canis* ni hubo amplificación de ADN Ehrlichial mediante la PCR. A los seis días PI se evidenció amplificación del ADN Ehrlichial a través de la PCR (Figuras 41 y 42) y a los 14 días PI hubo seroconversión. La falta de capacidad de los microorganismos para infectar la línea celular DH82 pudo deberse a que las Ehrlichias no estaban suficientemente adaptadas a las condiciones *in vitro*; o tal vez a que no se produjo una unión apropiada entre los receptores a nivel de superficie en las células de la línea celular y los ligandos presentes en la superficie de las Ehrlichias, quizás porque la Ehrlichia de nuestro estudio sea una cepa diferente de las Ehrlichias Monocíticas aisladas hasta los momentos. También descartamos la posibilidad de que las células no estuvieran funcionando bien como sistema de aislamiento; para demostrarlo realizamos ensayos de infección con promastigotas de *Leishmania* (forma evolutiva que cambia a amastigota intracelular cuando está en un sistema de macrófagos) observando que al cabo de tres días las promastigotas se transformaron en amastigotas intracelulares (resultados no mostrados), por lo que la posibilidad quedó rechazada.

En esta investigación se realizaron dos inoculaciones experimentales: una con la finalidad de obtener sangre para realizar los cultivos primarios infectados y otra para comprobar que los cultivos primarios eran viables y por lo tanto tenían capacidad infectante. Aunque entre nuestros objetivos no se contemplaba evaluar la evolución clínica y hematológica de los animales sometidos a la inoculación experimental, observamos diferencias importantes entre los dos perros que consideramos convenientes comentar. El perro de la primera inoculación experimental manifestó una clínica moderada de Ehrlichiosis Canina mientras que el cuadro clínico del perro de la segunda inoculación fue más severo. Probablemente y semejante a lo reportado por Harrus *et al.* (1998b), la divergencia se deba a que el primer perro estaba esplenectomizado mientras que el segundo no. En la investigación realizada por los autores antes señalados se compara la evolución clínica y hematológica después de la inoculación con *E. canis* de un grupo de perros esplenectomizados y otro sin

esplenectomizar; por las diferencias encontradas entre los dos grupos, los investigadores sugieren que el bazo juega un papel importante en la patogénesis de la Ehrlichiosis Monocítica Canina.

En los dos perros inoculados experimentalmente, pudimos apreciar pérdida del apetito y decaimiento después de administrar el inóculo infectante. Las diferencias observadas entre ambos animales están referidas al tiempo en que manifestaron los signos clínicos: en el primer perro la clínica se evidenció en el día 14 PI y en el segundo al sexto día de haber realizado la inoculación, de manera que podemos deducir que el período de incubación fue diferente en ambos perros. Este hallazgo puede estar relacionado a que la dosis bacteriana suministrada no fue la misma; en el primer perro el inóculo estuvo constituido por 5 ml de sangre total mientras que el segundo fue inoculado con 5 ml de cultivo puro de monocitos con un 60 % de células infectadas. Está documentado que la dosis de Ehrlichias influye en el grado de severidad con que se presentan las manifestaciones clínicas y es posible que esté relacionada con el acortamiento o prolongación del período de incubación (Price y Sayer, 1983; Rikihisa, 1991).

Otro aspecto importante a considerar es el hecho de que el animal utilizado en la primera inoculación estuviera seropositivo antes de la administración del inóculo, lo cual nos indicaba que ya había estado infectado con Ehrlichia Monocítica Canina y por la apariencia clínica y hematológica se podría sugerir que el perro se encontraba en una fase subclínica antes de la inoculación. Semejante a este resultado es el reportado por Buhles *et al.* (1974) quienes re infectaron 6 perros Pastores Alemanes con Ehrlichiosis Canina crónica, observando que los animales manifestaron cambios clínicos y hematológicos moderados y de duración más corta que aquellos frecuentemente evidenciados en la fase aguda. Sin embargo, hay otra investigación en la cual cuando re infectan dos perros Pastores Alemanes, estos animales desarrollaron signos clínicos de Ehrlichiosis Canina indistinguibles de los exhibidos cuando se infectaron la primera vez (Nyindo *et al.*, 1980). Comparando los resultados de estas

dos investigaciones con la presente se podría sugerir que la respuesta a una reinfección depende muy particularmente del sistema inmune de cada individuo más que de la protección que pueda conferir la inmunidad humoral.

Uno de los parámetros clínicos evaluados fue la temperatura corporal y observamos que el primer perro inoculado (esplenectomizado) no presentó fiebre ni antes ni después de la administración del inóculo (Figura 7) mientras que en el segundo se apreciaron picos febriles a partir del día 15 PI hasta el día 24 PI cuando se inició el tratamiento (Figura 17). Estas diferencias también fueron referidas por Harrus *et al.* (1998b) entre los perros esplenectomizados y los no esplenectomizados. La fiebre puede ser inducida por pirógenos endógenos como la Interleuquina-1 y el factor de necrosis tumoral, citocinas secretadas por los macrófagos. Es probable que con la esplenectomía se estén eliminando una gran cantidad de linfocitos (estimuladores) y macrófagos (células secretoras), lo cual conlleva a una disminución de la concentración de pirógenos endógenos durante la infección (Harrus *et al.*, 1998b).

Con relación a las determinaciones hematológicas, en el primer perro se observó anemia (Figura 8) mas no leucopenia, a pesar de que los valores leucocitarios disminuyeron con respecto al conteo evaluado al inicio de la inoculación y se detectó una trombocitopenia moderada (Figura 9). Este canino recuperó espontáneamente el apetito y el valor de las plaquetas sin necesidad de aplicar tratamiento. El perro de la segunda inoculación presentó anemia (Figura 18), leucopenia, y la trombocitopenia fue más acentuada que en el primero (Figura 19). Antes de realizar la inoculación experimental, el primer animal mantenía recuentos plaquetarios elevados (trombocitosis) debido a la esplenectomía (Bush, 1999) y esta debe ser la razón por la cual se observó la trombocitopenia moderada. En cambio la trombocitopenia severa del segundo animal inoculado pudo estar influenciada por la presencia de Acs antiplaquetarios, los cuales han sido descritos durante la fase aguda en perros con Ehrlichiosis Monocítica Canina. Al quedar las plaquetas recubiertas por estos Acs son

destruidas por los macrófagos del bazo o por lisis mediada por el complemento (Neer, 2000).

Otro objetivo importante de este trabajo de investigación fue la identificación molecular de *E. canis* y *E. chaffeensis* en las muestras sanguíneas de los perros infectados naturalmente, en los cultivos primarios y en las muestras sanguíneas de los perros infectados experimentalmente. Este objetivo se cumplió a través de la PCR, utilizando una de las variantes de la técnica original, la PCR anidada, por su alta sensibilidad, reportada en el diagnóstico de Ehrlichias (Dawson *et al.*, 1994).

Cuando realizamos el primer experimento para estandarizar la PCR se siguieron las condiciones reportadas por Wen *et al.* (1997), en cuanto a concentraciones de los diferentes componentes de la mezcla de reactivos, esquema de temperaturas y lapsos de tiempos. Se escogieron estas condiciones porque al realizar el análisis de las diferentes publicaciones referentes a PCR anidada, estos investigadores habían optimizado las condiciones de la primera PCR al reportar que habían logrado obtener productos visibles en gel de agarosa utilizando los cebadores ECC/ECB, a diferencia de otros que no lo habían logrado (Dawson *et al.*, 1994; Dawson *et al.*, 1996a). Cuando se compararon las condiciones utilizadas entre lo reportado por Dawson *et al.* (1996a) y Wen *et al.* (1997) se encontraron diferencias en relación a concentraciones de MgCl₂, cebadores y temperatura de hibridación. Por otra parte, las condiciones reportadas por Dawson *et al.* (1994) son las mismas que las de Dawson *et al.* (1996a) con la diferencia que estos últimos investigadores para amplificar el fragmento de la región del gen ARNr 16S correspondiente a *Ehrlichia* sp., lo hacen en dos rondas de PCR; una primera PCR utilizando los cebadores ECC/ECB sin la formación de producto visible y una segunda PCR utilizando las mismas condiciones de la primera y los cebadores: HCA (5'-AACACATGCAAGTGCAACGGA-3') y HE1 (5'-CAATTGCTTATAACCTTTTGGTTATAAAT-3'); el producto de la segunda PCR lo visualizaron en el gel de agarosa y luego aplicaron una tercera ronda de PCR

utilizando como plantilla de ADN este producto y los cebadores ECA/HE3 para la especie *E. canis* y HE1/HE3 para la especie *E. chaffeensis*. Esta metodología no fue utilizada por considerarla muy compleja al tener que realizar tres rondas de PCR.

Se inició de la estandarización sometiendo la primera PCR a una temperatura de hibridación de 60 °C con el ADN contenido en 1 µl y 10 µl del extracto de células infectadas con *E. canis* y *E. chaffeensis*. Se utilizaron estos dos volúmenes porque el ADN disponible es una mezcla de ADN de las células hospedadoras y ADN de *Ehrlichia*; este último ADN puede estar en muy altas o en muy bajas concentraciones y estas dos situaciones producen resultados falsos negativos (Warner y Dawson, 1996); este mismo criterio se siguió cuando se analizaron las muestras problemas. En la primera prueba de PCR también se utilizaron 20 ng y 200 ng de *E. coli* como control de otra especie bacteriana. Los análisis electroforéticos en gel de agarosa permitieron observar bandas muy semejantes en cuanto a grosor e intensidad cuando se usó el ADN de *E. coli* y el ADN de *Ehrlichia* (ver Figura 24). Como la hibridación de los cebadores ECC/ECB con el ADN de *E. coli* es imperfecta (demostrado con el análisis de secuencia), se esperaba un rendimiento menor en los productos amplificados del ADN de *E. coli*. Obviamente, era necesario encontrar condiciones que seleccionaran las hibridaciones más perfectas para poner en evidencia las diferencias esperadas. Para ello se decidió realizar el ensayo con temperaturas de hibridación mayores. Luego de realizados los ensayos se verificó que el rendimiento de los productos del ADN de *Ehrlichia* no fue modificado negativamente por la temperatura de hibridación, ya que a medida que se aumentó la temperatura la intensidad y el grosor de los productos formados, lejos de disminuir, mostraron tendencia a aumentar, mientras que la intensidad y grosor de las bandas con el ADN de *E. coli* disminuyeron, quedando establecida la temperatura de hibridación en 68 °C. Es de hacer notar que esta temperatura de hibridación difiere significativamente de la reportada en otros trabajos (Dawson *et al.*, 1994; Dawson *et al.*, 1996a; Wen *et al.*, 1997; Harrus *et al.*, 1998a) y permite eliminar del análisis las muy posibles contaminaciones con material genético de otras bacterias.

La segunda PCR se llevó a cabo usando las condiciones previamente reportadas por Wen *et al.* (1997). Sin embargo, el análisis computarizado previo de la secuencia de los cebadores ECA, específico para la especie *E. canis*, y HE1, específico para *E. chaffeensis*, indicó que ambos pueden formar dímeros estables a temperaturas de fusión de 60,3 °C, temperatura que coincide con la temperatura de hibridación a la cual se desarrolla la PCR (Wen *et al.*, 1997). Debido a que teóricamente si se realizaba la PCR sin desnaturalizar previamente los cebadores, estos no estarían disponibles para hibridizar con el ADN, se decidió calentar los cebadores a 80 °C durante dos minutos para desnaturalizarlos antes de añadirlos a la mezcla de PCR. Realizado el ensayo y comparado con el ensayo sin desnaturalizar previamente los cebadores, se determinó que calentándolos se formaban productos más definidos. Esta condición de desnaturalización de los cebadores antes de añadirlos a la mezcla de PCR no es referida en la bibliografía revisada y puede permitir, en un estudio posterior, optimizar la adición de cebadores y ADN para hacer más económica la determinación. También se hicieron ensayos utilizando 1 µl, 2 µl y 5 µl del producto formado en la primera PCR como plantilla de la segunda PCR, visualizándose un producto mejor definido cuando se usó el volumen de 1 µl; este volumen igualmente ha sido utilizado en otros estudios (Dawson *et al.*, 1994; Dawson *et al.*, 1996a; Wen *et al.*, 1997).

Una vez estandarizada la técnica PCR anidada, se logró la identificación molecular de la especie de Ehrlichia Monocítica que estaba infectando a los nueve perros. En el presente trabajo se demostró la importancia de realizar la PCR con volúmenes diferentes de ADN (1 µl y 10 µl) tal como lo recomiendan Warner y Dawson (1996). Se pudo observar que cuando se realizaron la primera y segunda PCR con 1 µl de ADN correspondiente al perro N° 8 (Figura 26 y Figura 28, canal 9) hubo amplificación del producto esperado mientras que al usar 10 µl de ADN (Figura 27 B y Figura 29 B, canal 10) se inhibió la amplificación, posiblemente debido a un exceso de ADN. Lo contrario ocurrió con el ADN de los perros N° 7 y N° 9, cuyas cantidades

de ADN estaban tan disminuidas que no hubo amplificación y formación de productos en la primera PCR con 1 µl (Figura 26, canales 8 y 10) y 10 µl de ADN (Figura 27 B, canales 9 y 11). La banda correspondiente al producto amplificado se logró visualizar cuando se realizó la segunda PCR con el producto de la primera amplificación realizada con 10 µl de ADN; esto se puede observar en la Figura 29 B, canales 9 (perro N° 7) y 11 (perro N° 9).

En las muestras sanguíneas de los nueve perros se identificó molecularmente la especie correspondiente a *E. canis*. Este resultado era el esperado, ya que los signos clínicos, datos hematológicos y observación de mórulas intracitoplasmáticas en las células mononucleares sanguíneas de los perros así lo indicaban, tal como está ampliamente reportado desde 1935, cuando los investigadores Donatien y Lestoquard del Instituto Pasteur de Argelia realizan la primera publicación en la que describen tanto las características clínicas de los perros como los extendidos sanguíneos con este nuevo microorganismo (Huxsoll *et al.*, 1970; Huxsoll *et al.*, 1972; Buhles *et al.*, 1974; Kuehn y Gaunt, 1985; McDade, 1990; Harrus *et al.*, 1997; Neer, 2000). Cabe destacar que este trabajo constituye el primer reporte en Venezuela que pone en evidencia por medio de una herramienta tan precisa como la PCR, la presencia de *E. canis* en el estado Aragua, aunque publicaciones anteriores a la realización de este trabajo habían demostrado molecularmente la presencia de *E. canis* en perros de los estados Lara (Unver *et al.*, 2001) y Zulia (Suksawat *et al.*, 2001a); faltaría por demostrar si se trata de la misma cepa reportada en los estados referidos. Esto podría lograrse fácilmente mediante la secuenciación del fragmento parcial amplificado correspondiente al gen que codifica el ARNr 16S.

El hallazgo más relevante de nuestro trabajo lo constituyó la identificación de *E. chaffeensis* en perros, como se muestra en la Figura 31; estos cuatro animales, además estaban positivos a *E. canis*, por lo tanto padecían coinfección con las dos Ehrlichias Monocíticas. Este resultado representa tres aportes importantes en las investigaciones sobre Ehrlichiosis en nuestro país: por un lado, es el segundo reporte a

nivel mundial de *E. chaffeensis* en perros; en segundo lugar, es el primer reporte en Venezuela y Sur América de *E. chaffeensis* en perros y por el otro, es la primera documentación de coinfección de *E. canis* y *E. chaffeensis* en nuestro país y Sur América

E. chaffeensis es el agente etiológico de la Ehrlichiosis Monocítica humana, reconocida a partir del año 1991 cuando Anderson *et al.* (1991) la diferenciaron de *E. canis* mediante secuenciación del gen parcial ARNr 16S. El primer caso de Ehrlichiosis Monocítica humana en Estados Unidos, se reporta en el año de 1987 (Maeda *et al.*, 1987) y desde ese año hasta 1991 se pensaba que *E. canis* podría ser la causante de los casos humanos debido a que los sueros reaccionaban con Ag de esta especie. No obstante, habían estudios que reportaban ausencia de asociación entre infección o enfermedad y el contacto o tenencia de perros, por lo que se sugería que probablemente este animal no era el reservorio (Fishbein *et al.*, 1987; Fishbein *et al.*, 1989; Harkess *et al.*, 1989). Además, otras investigaciones evidenciaban una asociación entre los pacientes con Ehrlichiosis, la exposición y/o picadura de garrapatas (Fishbein *et al.*, 1989; Dumler y Walker, 1991; Anderson *et al.*, 1992b). Esto se dilucidó al comprobarse que el microorganismo responsable de la Ehrlichiosis humana era una especie diferente a *E. canis* y lo que estaba ocurriendo con los sueros humanos era consecuencia de una reacción cruzada. Por otro lado, Anderson *et al.* (1992b) detectaron ADN de *E. chaffeensis* mediante PCR en la garrapata *Amblyomma americanum* y *Dermacentor variabilis*, sugiriendo a estas garrapatas como vectores potenciales de esta Ehrlichia. Quedaba entonces por resolver cual mamífero estaba actuando como reservorio y luego de varios años de investigaciones se logró determinar que el venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) es el reservorio natural de *E. chaffeensis* (Dawson *et al.*, 1994; Dawson *et al.*, 1996b; Lockhart *et al.*, 1997).

Existen otros estudios que sugieren que el perro puede ser un reservorio potencial de *E. chaffeensis*. En uno de estos estudios, se identifica *E. chaffeensis*

infectando naturalmente a perros del sureste de Virginia (Dawson *et al.*, 1996a), mientras que en otro, Dawson *et al.* (1992) demuestran la susceptibilidad de cuatro cachorros caninos a infectarse experimentalmente con *E. chaffeensis*. Algunos de estos animales no presentaron manifestaciones clínicas y otros manifestaron una sintomatología moderada. Por otro lado, Breitschwerdt *et al.* (1998) describen tres perros con signos clínicos de Ehrlichiosis severa en quienes se aísla y se identifica molecularmente *E. chaffeensis*. En Venezuela, el primer caso de Ehrlichiosis humana fue diagnosticado serológicamente utilizando Ag de *E. chaffeensis* (Arraga- Alvarado *et al.*, 1996). En nuestro trabajo identificamos *E. chaffeensis* en perros del estado Aragua, por lo que es muy probable que esté circulando esta especie en humanos. Con la identificación de *E. chaffeensis* en perros de Venezuela se plantea una serie de preguntas que tan solo podrán ser respondidas con sucesivas investigaciones: ¿El perro es un reservorio natural o accidental de *E. chaffeensis*? ¿Hay otros mamíferos que estén actuando como reservorios naturales de *E. chaffeensis*? ¿Cuál especie(s) de garrapata(s) está(n) involucrada(s) en la transmisión de *E. chaffeensis*? ¿Hay humanos infectados con *E. chaffeensis*?

Semejante a lo encontrado en este estudio, la coinfección en perros con diferentes especies de Ehrlichias ha sido documentada por Kordick *et al.* (1999), quienes identificaron hasta cuatro especies Ehrlichiales, entre ellas *E. chaffeensis* coinfectando un mismo perro. Por otro lado, Breischwerdt *et al.* (1998) y Suksawat *et al.* (2001a) evidenciaron coinfección con *E. canis/E. equi* y *E. canis/E. platys* respectivamente. Es por lo tanto interesante explorar la posibilidad de coinfección con otras especies en estudios futuros. Este hallazgo refleja la importancia de contar con una herramienta como la PCR para el diagnóstico de Ehrlichiosis, ya que con otras técnicas como la IFI es imposible distinguir entre especies de un mismo genogrupo, en las que hay reacción cruzada, como por ejemplo: *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii*. Hasta ahora no se sabe como influye la coinfección en las manifestaciones clínicas o en el manejo terapéutico de los perros; deben hacerse estudios futuros que incluyan este grupo de perros y permitan aclarar esta situación.

La sangre con la que se inoculó el primer perro estaba infectada únicamente con *E. canis* (Figura 33), sin embargo el perro inoculado experimentalmente estaba coinfectado con *E. canis* y *E. chaffeensis* antes de la administración del inóculo o día 0 de la inoculación experimental (canal 7, Figura 35 y canal 2, Figura 36). A pesar de esto, este perro presentó manifestaciones clínicas y hematológicas de Ehrlichiosis Canina. Otro hallazgo que nos permite afirmar que en este canino aumentó la carga bacteriana por *E. canis* potenciado por la inoculación, fue el hallazgo de las bandas observadas, las cuales incrementaron en intensidad y grosor desde el día 14 al 23 PI, indicando que estaba aumentando la cantidad de ADN Ehrlichial circulante (canales 9, 13, 14 y 15, Figura 35).

Con relación a la PCR realizada con las muestras correspondientes a los cultivos primarios, era de esperarse que se aislaran las dos especies: *E. canis* y *E. chaffeensis* (Figuras 38 y 39), ya que en la sangre del perro con la que se realizaron los cultivos estaban circulando ambas especies. Del mismo modo, también era de esperarse que el perro inoculado experimentalmente con los cultivos primarios se coinfectara con ambas especies. Esta aseveración está demostrada porque este canino, antes de ser inoculado, no presentaba Acs contra el Ag de *E. canis* y no se detectó ADN de Ehrlichia por PCR (canal 2 de las Figuras 41 y 42). Después de la inoculación hubo seroconversión en el animal y se detectó ADN de *E. canis* y *E. chaffeensis* (canales 3 al 7 de las Figuras 41 y 42).

Los resultados encontrados en nuestro estudio sientan las bases para futuras investigaciones relacionadas con el aislamiento de este microorganismo y con la identificación molecular del resto de las especies Ehrlichiales. Esto permitirá ampliar los conocimientos acerca de estos agentes en nuestro medio y su verdadero papel en la instauración tanto de infecciones como de enfermedades en caninos y otros mamíferos incluyendo el hombre.

VI. CONCLUSIONES

- ❖ En la muestra de caninos analizados, clínicamente sanos, existe una alta frecuencia de perros seropositivos al Ag de *E. canis* (84,6 %).
- ❖ La anemia y trombocitopenia constituyeron las modificaciones hematológicas predominantes (100 %) de Ehrlichiosis Canina en los perros seleccionados para realizar el aislamiento del agente causal.
- ❖ Las características ultraestructurales de los cuerpos elementales incluidos dentro de vacuolas citoplasmáticas, permiten deducir que las mórulas intracitoplasmáticas observadas en las células mononucleares de los perros estudiados corresponden a bacterias del género *Ehrlichia*.
- ❖ La técnica de PCR anidada, permitió la identificación de *E. canis* y *E. chaffeensis* en caninos del estado Aragua con signos clínicos de Ehrlichiosis Canina.
- ❖ En los cultivos primarios se aislaron y se identificaron las especies *E. canis* y *E. chaffeensis*.
- ❖ Se comprobó que los microorganismos aislados tenían capacidad infectante, por cuanto el perro inoculado experimentalmente con los cultivos primarios se infectó con *E. canis* y *E. chaffeensis*, manifestando signos clínicos de Ehrlichiosis Canina.

VII. RECOMENDACIONES

- ❖ Continuar las investigaciones que conlleven al aislamiento de Ehrlichia Monocítica Canina con la finalidad de estudiar la biología, susceptibilidad a drogas como también obtener Ag para realizar estudios epidemiológicos.
- ❖ Realizar secuenciación de los fragmentos de ADN obtenidos por PCR para determinar si las cepas que circulan en nuestro país son semejantes o diferentes a las reportadas en la literatura.
- ❖ Establecer la relación entre las especies de Ehrlichias Monocíticas Caninas y signos clínicos a fin de discriminar si la gravedad de la enfermedad está unida a la especie que la causa.
- ❖ Identificar por PCR las diferentes especies de Ehrlichias que pudieran estar presentes en las garrapatas para precisar la capacidad vectorial de las mismas.
- ❖ Identificar por PCR *E. canis* y *E. chaffeensis* en especies de mamíferos diferentes al perro con la finalidad de contribuir en el esclarecimiento de los reservorios.
- ❖ Esclarecer por técnicas de biología molecular el potencial como reservorio de mamíferos diferentes al perro.
- ❖ Conociendo que está reportada la identificación molecular de una cepa de *E. canis* en un humano asintomático de Venezuela y que *E. chaffeensis* está

circulando en perros, determinar si estas dos Ehrlichias están presentes en humanos con signos clínicos de Ehrlichiosis humana.

- ❖ Estandarizar la PCR utilizando cebadores que amplifiquen el ADN de otras especies Ehrlichiales reportadas en perros, con el objetivo final de conocer cuáles especies están presentes en nuestra geografía.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Anderson, B.; Dawson, J.; Jones, D. and Wilson, K. (1991). *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. **29**: 2838-2842.
- Anderson, B., Greene, C., Jones, D. and Dawson, J. (1992a). *Ehrlichia ewingii* sp. nov. The etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. Int. J. Syst. Bacteriol. **42**: 299-302.
- Anderson, B., Summer, J., Dawson, J., Tzianabos, T., Greene, C., Olson, J., Fishbein, D., Olsen-Rasmussen, M., Holloway, B., Edwin, G. and Azad A. (1992b) Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. **30**: 775-780).
- Arraga-Alvarado, C. (1992). Ehrlichiosis canina en Maracaibo, estado Zulia. Reporte de 55 casos. Rev. Cient. Univ. F.C.V. de LUZ. II **2**:30-40.
- Arraga-Alvarado C; Montero, M.; Bernardoni, A.; Anderson, B y Parra, O. (1996). Ehrlichiosis humana: reporte del primer caso en Venezuela. Invest. Clin. **37**: 35-49.
- Arraga-Alvarado, C. (1997). Ehrlichias que afectan a caninos: Situación y Avances en el estudio de estas Rickettsias en Venezuela. Ponencia presentada en el II Congreso Nacional SOVEMEVEPA. IV Encuentro Latino Americano de Médicos Veterinarios especialistas en pequeños animales. Barquisimeto, edo. Lara.
- Arraga-Alvarado, C., Parra, O., Palmar, M., Chango, R. y Alvarado, M. (1997): *Ehrlichia platys*: preparación del antígeno y uso de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en caninos y humanos. Revista Científica, Universidad del Zulia, Venezuela. **VII**: 30-40.
- Bakken, J., Dumler, J., Chen, S., Eckman, M., Van, L. and Walker, D. (1994). Human granulocytic ehrlichiosis in the upper midwest united states. A new species emerging?. JAMA **272**:212-218.

- Bool, P. and Sutmöller, P. (1957). *Ehrlichia canis* infections in dogs on Aruba (Netherlands Antilles). JAMA. **130**: 418-420.
- Bouloy, R., Lappin, M., Holland, C., Thrall, M., Baker, D. and O'Neil, S. (1994). Clinical ehrlichiosis in a cat. JAVMA. **204**: 1474-1477.
- Böyum A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. **21** Suppl. 97 (Paper IV): 77-89.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ann. Biochem. **72**: 248-254.
- Breitschwerdt, E., Hegarty, B. and Hancock, S. 1998. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella vinsonii*. J. Clin. Microbiol. **36**: 2645-2651.
- Brouqui, P., Birg, M., and Raoult, D. (1994). Cytopathic effect, plaque formation, and lysis of *Ehrlichia chaffeensis* grown on continuous cell lines. Infect. Immun. **62**: 405-411.
- Brouqui, P., Dumler, J., Raoult, D. and Wlaker, D. (1992). Antigenic Characterization of Ehrlichiae: Protein Immunoblotting of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia sennetsu* and *Ehrlichia risticii*. J. Clin. Microbiol. **30**: 1062-1066.
- Buhles, W., Huxsoll, D. and Ristic, M. (1974). Tropical canine pancytopenia: clinical, hematologic, and serologic responses of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. J. Infect. Dis. **130**: 357-367.
- Buller, R., Arens, M., Hmiel, S., Paddock, C., Summer, J., Rikihisa, Y., Unver, A., Gaudreault-Keener, M., Manian, F., Liddell, A., Schmulewitz, N., and Storch, G. (1999). *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human Ehrlichiosis. N. Engl. J. Med. **341**: 148-155.
- Bush, B. (1999). Interpretación de los Análisis de Laboratorio para Clínicos de Pequeños Animales. (Ed. Harcourt S.A.). Madrid, España.
- Campbell, R. (1994). Pathogenesis and pathology of the complex rickettsial infection. Veterinary Bulletin. **64**: 1-18.
- Carter, G., Seamer, J. and Snape, T. (1971). Diagnosis of Tropical Canine Pancytopenia (*Ehrlichia canis* infection) by immunofluorescence. Rev. Vet. Sci. **12**: 318-322.

- Chen, S., Dumler, J., Bakken, J. and Walker, D. (1994). Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 589-595.
- Conrad, M. (1989). Review: *Ehrlichia canis*: a tick-borne rickettsial-like infection in humans living in the southeastern United States. *Am. J. Med. Sc.* **297**: 35-37.
- Coronado, A. y Mujica, F. (1998). Eficacia de diferentes acaricidas en el control de *Rhipicephalus sanguineus* (Acarina: Ixodidae). *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **38**: 119-122.
- Dawson, J., Anderson, B., Fishbein, D., Sanchez, J., Goldsmith, C., Wilson, K. and Duntley, W. (1991a). Isolation and characterization of a *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2741-2745.
- Dawson, J., Rikihisa, Y., Ewing, S. and Fishbein, D. (1991b). Serologic Diagnosis of human ehrlichiosis using two *Ehrlichia canis* isolates. *J. Infect. Dis.* **163**: 564-567.
- Dawson, J. and Ewing, S. (1992). Susceptibility of dogs to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, causative agent of human Ehrlichiosis. *Am. J. Vet. Res.* **53**: 1322-1327.
- Dawson, J., Stallknecht, D., Howerth, E., Warner, C., Biggie, K., Davidson, W., Lockhart, J., Nettles, V., Olson, J., and Childs, J. (1994). Susceptibility of White-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 2725-2728.
- Dawson, J., Biggie, K., Warner, C., Cookson, K., Jenkins, S., Levine, J. and Olson, J. (1996a). Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. *Am. J. Vet. Res.* **57**: 1175-1179.
- Dawson, J., Warner, C., Baker, V., Ewin, S., Stallknecht, D., Davidson, W., Kocan, A., Lockhart, M., and Olson, J. (1996b). Ehrlichia-like 16S rDNA sequence from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Parasitol.* **82**: 52-58.
- De Vera, M. y Pereira, L. (1998). Comportamiento hematológico y epidemiológico de los casos de Trombocitopenia Cíclica Canina, diagnosticados en el Hospital de Pqueños Animales durante el año 1997. I Simposium Nacional Hemoparásitos y sus vectores. Trabajos libres. Memorias, 45

- Dumler J. and Walker D. (1991). Human ehrlichiosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **4**: 597-602.
- Dumler, J., Chen, S., Asanovich, K., Trigiani, E., Popov, V. and Walker, D. (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.
- Dumler, J. and Bakken, J.(1998). Human ehrlichiosis: Newly recognized infections transmitted by ticks. *Ann. Rev.Med.* **49**: 201-213.
- Dumler, J., Barbet, A., Bekker, C., Dasch, G., Palmer, G., Ray, S., Rikihisa, Y. and Rurangirwa, F. (2001). Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinatios and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonymes of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 2145-2165.
- Espinosa de los Monteros, L. (1993). Reacción de polimerasa en cadena (PCR) en el diagnóstico clínico. Revisión del uso de la técnica. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* **35**: 225-230.
- Ewing, S. (1963). Observations on leukocytic inclusion bodies from dogs infected with *Babesia canis*. *JAVMA.* **143**: 503-506.
- Fishbein D., Sawyer L. Holland C., Hayes E., Okoroanyanwu W., Williams D., Slkes K., Ristic M. and McDade J. (1987). Unexplained febrile illnesses after exposure to ticks. Infection with an *Ehrlichia*?. *JAMA.* **257**: 3100-3104.
- Fishbein D., Kemp A., Dawson J., Greene M., Redus M. and Fields D. (1989). Human ehrlichiosis: prospective active surveillance in febrile hospitalized patients. *J. Infect. Dis.* **160**: 803-809.
- Fishbein, D. and Dawson, J. (1991). *Ehrlichiae*. En: *Manual Clinical Microbiology* (Balows A., Hauser W., Herman K., Isenberg H. y Shadomy H. Eds.). New York. Fifth Edition. pp 1054-1058.
- García, F., Rivera, M., García, M., González, M. y Avilán, P. (1992). Situación actual. de la casuística de la ehrlichiosis canina en perros de Maracay. Análisis de diagnóstico de labradores. *Bol. de Inst. Mejoramiento profesional "Paulo Llamasa", Fed.Col.Vet.Mimec.*

- García, C., Delgado, R. y Rosales, B. (1999). Perfil hematológico de caninos con hábitos callejeros (Resumen). IV Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. VII Congreso Nacional SOVVEC: Trabajos libres. Memorias, **11**: 536-538.
- Ghorbel, A., Clerc, B. and Djaiem, A. (1994). Canine Ehrlichiosis in Tunisia. Seroepidemiological survey. Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop. **47**: 271-275.
- Goodman, J., Nelson, C., Vitale, B., Madigan, J., Dumler, J., Kurtti, T., and Munderloh, U. (1996). Direct cultivation of the causative of human granulocytic ehrlichiosis. N. Engl. J. Med. **334**: 209-215.
- Groves, M., Dennis, G., Amyx, H. and Huxsoll, D. (1975). Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). Am. J. Vet. Res. **36**: 937-940.
- Gutiérrez, N., Martínez, M., Arraga-Alvarado, C., Bretaña, A., Pacheco, I. y Comach, G. (1999). Identificación ultraestructural de *Ehrlichia sp* en un perro de Venezuela infectado experimentalmente. Invest. Clin. **40**: 165-177.
- Harkess J., Ewin S., Crutcher J., Kudlac J., Mckee G. and Istre G. (1989). Human ehrlichiosis in Oklahoma. J. Infect. Dis. **159**: 576-579.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). Antibodies A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. pp 356-358.
- Harrus, S., Bark, H. and Waner, T. (1997). Canine monocytic ehrlichiosis: an update. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. **19**: 431-444.
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Foley, J., Poland, A. and Bark, H. (1998a). Amplification of Ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. J. Clin. Microbiol. **36**: 73-76.
- Harrus, S., Waner, T., Keysary, A., Aroch, I., Voet, H. and Bark, H. (1998b). Investigation of splenic functions in canine monocytic Ehrlichiosis. Vet. Immunol. Immunopathol. **62**: 15-27.
- Harvey, J., Simpson, C. and Gaskin, J. (1978). Cyclic thrombocytopenia induced by a *Rickettsia*-like agent in dogs. J. Infect. Dis. **137**: 182-188.
- Hemelt, I., Lewis, G., Huxoll, D., and Stephenson E. (1980). Serial Propagation of *Ehrlichia canis* in primary canine peripheral blood monocytes cultures. Cornell Vet. **70**: 37-42.

- Hibler, S., Hoskins, J. and Greene, C. (1986). Rickettsial infections in dogs. Part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. *Compend Cont. Educ. Pract. Vet.* **8**: 106-115.
- Hildebrandt, P., Conroy, J., Mckee, A., Nyindo, M., and Huxsoll, D. (1973). Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. *Infect. Immun.* **7**: 265-271.
- Hoilien, C., Ristic, M., Huxsoll, D., Rapmund, G. and Tachibana, N. (1982) *Rickettsia sennetsu* in human blood monocyte cultures: similarities to the growth cycle of *Ehrlichia canis*. *Infect. Immun.* **35**: 314-319.
- Huxsoll, D., Hildebrandt, P., Nims, R. and Walker, J. (1970). Tropical canine pancytopenia. *JAVMA.* **157**: 1627-1632.
- Huxsoll, D., Amyx, H., Hemelt, I., Hildebrandt, P., Nims, R. and Gochenour, W. (1972). Laboratory studies of Tropical Canine Pancytopenia. *Exper. Parasitol.* **31**: 53-59.
- Iqbal, Z. and Rikihisa, Y. (1994). Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissue of dogs after doxycycline treatment. *J.Clin. Microbiol.* **32**: 1644-1649.
- Iqbal, Z., Chaichanasiriwithaya, W., and Rikihisa, Y. (1994). Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J.Clin. Microbiol.* **32**: 1658-1662.
- Jackson, D., Hayden, J., and Quirke, P. (1991). En: Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. *PCR 1. A Practical Approach.* (Ed. Mcpherson, Quirke and Taylor). E.E.U.U. pp 29-50.
- Kakoma, I., Hansen, R., Anderson, B., Hanley, T., Sims, K., Liu, I., Bellamy, C., Long, M. and Baek, B. (1994). Cultural, molecular, and immunological characterization of etiologic agents for atypical canine ehrlichiosis. *J.Clin. Microbiol.* **32**: 170-175.
- Kakoma, I., Sainz, A., Tesouro, M., Amusategui, I., Kim, CH. and Biggerstaff, MG. (2000). Standardization of the diagnostic criteria for canine ehrlichiosis towards a universal case definition. *Ann N Y Acad Sci.* **916**: 396-403.
- Keysary, A., Waner, T., Rosner, M., Warner, C., Dawson, J., Zass, R., Biggie, K. and Harrus, S. (1996). The first isolation, *in vitro* propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel. *Vet. Parasitol.* **62**: 331-340.

- Kordick, S., Breitschwerdt, E., Hegarty, B., Southwick, K., Colitz, C., Hancock, S., Bradley, J., Rumbough, R., McPherson, J. and MacCormack, J. (1999). Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a walker hound kennel in North Carolina. *J.Clin. Microbiol.* **37**: 2631-2638.
- Kuehn, N. and Gaunt, S. (1985). Clinical and hematologic findings in Canine Ehrlichiosis. *JAVMA.* **186**: 355-358.
- Lewin, B. (1996). *Genes IV*. Press at Oxford. University Press, Oxford England. pp 515.
- Lewis, G., Ristic, M., Smith, R., Lincoln, T. and Stephenson, E. (1977). The Brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. *Am. J. Vet. Res.* **38**: 1953-1955.
- Lockart, J., Davidson, W., Stallknecht, D., Dawson, J., and Howert, E. (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.
- Luque, J. y Herráez, A. (2001). *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencia de la Salud.* (Ed. Harcourt S.A.). Madrid, España.
- Madigan, M., Martinko, J. and Parker, J. (1997). *Biology of Microorganisms*. Eighth edition (Prentice Hall International). (UK), London. pp 617-618.
- Maeda, K., Markowitz N., Hawley R., Ristic M., Cox D. and McDade J. (1987). Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *N. Engl. J. Med.* **316**: 853-856.
- Martínez, M. y Gutiérrez, N. (2000). Seroepidemiología de Ehrlichiosis Monocítica Humana en una comunidad del estado Aragua. Trabajo de ascenso para la categoría de profesor Agregado. Universidad de Carabobo. Núcleo Aragua. 123 p.
- Mathew, J., Ewing, S., Murphy, G., Kocan, K., Corsvet, R. and Fox, J. (1997). Characterization of a new isolate of *Ehrlichia platys* (Order Rickettsiales) using electron microscopy and polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.* **68**: 1-10.
- McDade, J. (1990). Ehrlichiosis- A disease on animals and humans. *J. Infec. Dis.* **161**: 609-616.

- Mcpherson, M., Jones, K., and Gurr, S. (1991). En: PCR with highly degenerate primers. PCR 1. A Practical Approach. (Ed. Mcpherson, Quirke and Taylor). E.E.U.U. pp 171-181.
- Meek, G. and Wiley, J. (1970). Electron Mycroscopy for biologists. Second edition. 73 p.
- Munderloh, U., Madigan J., Dumler, J., Goodman, J., Hayes, S., Barlough, J., Nelson, C., and Kurtti, T. (1996). Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, *Ehrlichia equi*, in tick cell culture. J. Clin. Microbiol. **34**: 664-670.
- Murphy, G., Ewing, S., Whitworth, L., Fox, J. and Kokan, A. (1998). A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. Vet. Parasitol. **79**: 325-339.
- Neer, M. (2000). Ehrlichiosis monocítica y granulocítica caninas. En: Enfrmedades Infecciosas en Perros y Gatos. Greene, G. Segunda edición. (Ed. McGraw-Hill International, México D.F.). pp 153-169.
- Nims, R., Ferguson, J., Walker, J., Hildebrandt, P., Huxsoll, D., Reardon, M., Varley, J., Kolaja, G., Watson, W., Shroyer, E., Elwell, P. and Vacura, G. (1971). Epizootiology of tropical canine pancytopenia in Southeast Asia. JAVMA. **158**: 53-63).
- Nyindo, M., Ristic, M., Huxsoll, D. and Smith, A. (1971). Tropical canine pancytopenia: *in vitro* cultivation of the causative agent-*Ehrlichia canis*. Am. J. Vet. Res. **32**: 1651-1658.
- Nyindo, M., Huxsoll, D., Ristic, M., Kakoma, I., Brown, J., Carson, C., and Stephenson, E. (1980). Cell-mediated and humoral immune responses of german shepherd dogs and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. Am. J. Vet. Res. **41**: 250-254.
- Ogden, N., Woldehiwet, Z. and Hart, C. (1998). Granulocytic ehrlichiosis: an emerging o rediscovered tick-borne disease? J. Med. Microbiol. **47**: 475-482.
- Pérez, M., Rikihisa, Y. and Wen B. (1996). *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. J. Clin. Micribiol. **34**: 2133-2139.
- Popov, V., Chen, S., Feng, H. and Walker, D. (1995). Ultrastructural variation of cultured *Ehrlichia chaffeensis*. J. Med. Microbiol. **43**: 411-421.

- Popov, V., Han, V., Chen, S., Feng, H., Tesh, A. and Walker, D. (1998). Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. J. Med. Microbiol. **47**: 235-251.
- Price, J. and Sayer, P. (1983). Canine Ehrlichiosis. En: Current Veterinary Therapy vol. VIII. (Kirk R. de.), Saunders W.B.Co., Philadelphia. pp 1197-1201.
- Relman, D. (1993). The identification of uncultured microbial pathogens. J. Infect. Dis. **168**: 1-8.
- Rikihisa, Y. (1991). The tribu *Ehrlichiae* and ehrlichial diseases. Clin. Microbiol. Rev. **4**: 286-308.
- Rikihisa, Y., Ewing, S., Fox, J., Siregar, A., Pasaribu, F. and Malole, M. (1992). Analyses of *Ehrlichia canis* and canine granulocytic *Ehrlichia* infection. J. Clin. Microbiol. **30**(1): 143-148.
- Ristic, M. and Huxsoll, D. (1984). Tribu II. Ehrlichiae. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.I N.R. Krieg and J.G. Holt (eds.), The Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp 704-709.
- Ristic, M., Huxsoll, D., Weisiger, R., Hildebrant, P. and Nyindo, M. (1972). Serologic diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. Infect. Immun. **6**: 226-231.
- Ruckebush, Y., Phaneuf, L. y Dunlop, R. (1994). Fisiología de Pequeñas y Grandes Especies. (Ed. El Manual Moderno S.A.). México, D.F.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Simpson, C. (1972). Structure of *Ehrlichia canis*. Am. J. Vet. Res. **33**:2451-2454.
- Sodikoff, CH. (2001). Laboratory Profiles of Small Animal Diseases a Guide to Laboratory Diagnosis. Third edition. (Mosby a Harcourt health sciens company).
- Suksawat, J., Pitulle, C., Arraga-Alvarado, C., Madrigal, K., Hancock, S., and Breitschwerd, E. (2001a) Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. J. Clin. Microbiol. **39**: 90-93.

- Suksawat, J., Xuejie, Y., Hancock, S., Hegarty, B., Nilkumhang, P. and Breitschwerdt, E. (2001b). Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vector-borne pathogens in dogs from Thailand. *J. Vet. Intern. Med.* **15**:453-462.
- Tamí, I., García, F., Tamí, M. y Arcía, R. (1994). Ehrlichiosis en animales y humanos de Venezuela. *Acta Cient.SVBE.* **3**: 19-24.
- Tamí, I., Martínez, M., Tamí, M., Redondo, C., Finol, H. and Simonovis, N. (1996). Identification of *Ehrlichia* species in blood smear. *Infect. Dis. in Clin. Pract.* **5**: 555-557.
- Taylor, G. (1991). En: Polymerase chain reaction: basic principles and automation. PCR 1. A Practical Approach. (Ed. Mcpherson, Quirke and Taylor). E.E.U.U. pp 1-14.
- Troy, G. and Forrester, D. (1993). En: Enfermedades Infecciosas. Perros y Gatos. Interamericana McGraw Hill. México. pp. 424-435.
- Tzianabos, T., Anderson, B., and Mcdad, J. (1989). Detection of *Rickettsia rickettsii* in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. *J. Clin.Microbiol.* **27**: 2866-2868.
- Unver, A., Pérez, M., Orellana, N., Huang, H., and Rikihisa, Y. (2001). Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. *J. Clin.Microbiol.***39**: 2788-2793).
- Walker, J., Rundquist, J., Taylor, R., Wilson, L., Andrews, M., Barck, J., Hogge, A., Huxsoll, D., Hildebrant, P and Nims, R. (1970). Clinical and clinicopathologic findings tropical canine pancytopenia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **157**: 43-55.
- Walker, D., and Dumler, J. (1996). Emergence of the ehrlichiosis as human health problems. *Emerg. Infect.* **2**: 18-29.
- Warner, C. and Dawson, J. (1996). En: Genus- and species- level identification of *Ehrlichia* species by PCR and sequencing. *PCR Protocols For Emerging Infectious Diseases: A Supplement To Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Application*, pp 100-105.
- Weisiger, R., Ristic, M. and Husxoll, D. (1975). Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method. *Am. J. Vet. Res.* **36**: 689-694.

- Wellman, M., Krakowka, S., Jacobs, R. and Kociba, G. (1988). A macrophage monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **24**: 223-229.
- Wen, B., Rikihisa, Y., Mott, J., Fuerst, P., Kawahara, M. and Suto, Ch. (1995). *Ehrlichia muris* sp. Nov., identified on the basis of 16S rRNA base sequences and serological, morphological, and biological characteristics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 250-254.
- Wen, B., Rikihisa, Y., Mott, J., Greene, R., Kim, H.-Y., Zhi, N., Couto, G., Unver, A., and Bartsch, R. (1997). Comparison of nested PCR with Immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1852-1855.
- Wilson, K., Blitchington, R. and Greene, R.(1990). Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J. Clin.Microbiol.* **28**: 1942-1946.

ANEXOS

ANEXO A

Conjugado anti-Ehrlichia Monocítica Canina

El conjugado anti-Ehrlichia Monocítica Canina era necesario para la determinación del porcentaje de células infectadas de los cultivos celulares mediante Inmunofluorescencia Directa. Para preparar este conjugado se necesitaban sueros con un título alto de Acs anti- Ehrlichia Monocítica Canina, por lo tanto se realizó un estudio serológico en 13 perros utilizando la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

Estudio serológico para obtener sueros negativos y sueros con un alto título de Acs anti- Ehrlichia Monocítica Canina

El estudio serológico también sirvió para seleccionar sueros negativos a ser utilizados como controles en las pruebas futuras. De los 13 perros, 4 de ellos eran de la raza Pastor Alemán, 4 Boxer, 1 Doberman y 4 mestizos. Para obtener el suero se extrajeron 6 ml de sangre y se colocó en un tubo sin anticoagulante; después que ocurrió la retracción del coágulo se centrifugó a 250 x g durante 10 minutos; el suero se transfirió a viales de 2 ml y se almacenó a -20°C hasta su uso.

La metodología utilizada para realizar la IFI es la descrita por Ristic *et al.* (1972) con pocas modificaciones, utilizando láminas de 10 pocillos con antígeno (Ag) de *E. canis* cepa de Florida. Las láminas con Ag y el suero control positivo y negativo fueron cedidos gentilmente por el Dr. Ibulaimu Kakoma (Departamento de Patobiología Veterinaria de la Universidad de Illinois de Estados Unidos). Para hallar la dilución del suero con la que se debía realizar la prueba cualitativa con los sueros problemas se ensayaron las diluciones 1/10, 1/20, 1/40 y 1/80 tanto del suero control negativo como del del suero control positivo; estas diluciones se realizaron en PBS pH 7,2.

Después de un período de incubación a 37°C durante una hora en cámara húmeda, las láminas se lavaron dos veces durante 10 minutos con PBS. De acuerdo a la recomendación del fabricante se preparó una dilución 1/20 de anti-IgG canina acoplada a isotiocianato de fluoresceína (Sigma Inmuno Chemicals) en una dilución 1/10 de Azul de Evans en PBS pH 7,2. Esta dilución del conjugado se añadió a cada uno de los pocillos incubándose a 37°C en cámara húmeda durante 35 minutos. Se realizaron dos lavados de la forma descrita anteriormente y un tercer lavado con agua destilada. Una vez que las láminas se secaron a temperatura ambiente, fueron cubiertas con una solución tamponada de glicerina y laminillas de 22 x 40 mm. El examen de los preparados se realizó con un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss) usando una fuente de luz ultravioleta.

Preparación del conjugado anti-Ehrlichia Monocítica Canina para la IFD

De los sueros de perros examinados con IFI se escogió uno con un título alto de Acs para realizar la precipitación de las Inmunoglobulinas con sulfato de amonio (NH_4SO_4) al 50 % (P/V) de acuerdo a metodología referida por Harlow y Lane (1988) con algunas modificaciones. Un volumen de suero se precipitó con dos volúmenes de NH_4SO_4 ; este proceso se llevó a cabo en baño de hielo y agitación constante. Se centrifugó a $3.180 \times g$ durante 40 minutos y el precipitado se disolvió con buffer fosfato salino (PBS) (Na_2HPO_4 75 mM; NaH_2PO_4 30 mM; NaCl 0,85 %) pH 7,4 en el mismo volumen inicial de suero. Se repitió una vez más el procedimiento de precipitación anterior y el nuevo volumen de precipitado disuelto se sometió a diálisis utilizando PBS pH 7,4. Culminado el proceso de diálisis se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Las proteínas se marcaron con isotiocianato de fluoresceína (Sigma Inmuno Chemicals) previamente disuelto en buffer fosfato 0,1 M pH 9 en una relación 0,055 mg de fluoresceína/mg de proteína. Se dejó en reposo a temperatura ambiente durante dos horas y luego se dializó con PBS pH 7,4. El conjugado fue almacenado a -20°C en alícuotas de 200 μl hasta su uso. Se estandarizó la dilución a la cual se utilizó el conjugado ensayando las diluciones del conjugado 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 y 1/160 en PBS pH 7,2 utilizando una lámina con Ag de *E. canis*. Una vez determinado el título de trabajo del conjugado se procedió a realizar la prueba de IFD tanto con las laminillas con células DH82 sospechosas de estar infectadas como con las laminillas con células DH82 utilizadas como controles.

ANEXO B

Equilibrio del Fenol para la extracción de ADN (Sambrook, *et al*, 1989)

Antes de utilizar, el fenol debe ser equilibrado a $\text{pH} > 7,8$ debido a que pH ácido el DNA se queda en la fase orgánica.

1. El fenol líquido debe ser almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cuando se necesite, permitir que llegue a temperatura ambiente y entonces descongelar a $68\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al fenol descongelado, añadir un volumen igual de buffer y mezclar con un agitador magnético durante 15 minutos.
2. Al separarse las dos fases descartar la fase acuosa y añadir un volumen igual de buffer TRIS-Hcl 0,1 M pH 8. Mezclar con un agitador magnético durante 15 minutos.
3. Remover la fase acuosa y repetir el paso 2 hasta que el pH de la fase fenólica sea > 7.8 (Medir el pH con papel de pH).
4. Después que el fenol se ha equilibrado y la fase acuosa final ha sido removida, añadir 0,1 volumen de bufer TRIS-Hcl 0,1 M pH 8 que contiene 0,2% de β -mercaptoetanol. La solución de fenol puede ser almacenada bajo la forma TRIS-Hcl 100 mM pH 8 en botellas ámbar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta por 1 mes.

Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24:1)

Es una mezcla que consiste de partes iguales de fenol equilibrado y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se utiliza para remover proteínas de las preparaciones de ácidos nucleicos. El cloroformo desnatura proteínas y facilita la separación de las fases acuosas y orgánicas. El alcohol isoamílico reduce la formación de espuma durante la extracción. Ni el cloroformo ni el alcohol isoamílico requieren tratamiento previo.

ANEXO C

Electroforesis en gel de agarosa (Sambrook *et al*, 1989)

1. Preparar la cámara de electroforesis, colocando los separadores en los extremos.
2. Pesar la agarosa de acuerdo al porcentaje al que se va a preparar.
3. Una vez mezclada la agarosa con el buffer TBE (Tris 90 mM; ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM) se calienta en el microonda durante 2 a 3 minutos.
4. Añadir la agarosa en un beaker y agregar bromuro de etidio al 0,005 % y mezclar.
5. Se deja enfriar y se vierte la agarosa suavemente en el centro de la cámara de electroforesis.
6. Colocar el peine con los canales separadores y se deja gelificar a temperatura ambiente.
7. Una vez que la agarosa gelifica, quitar los separadores laterales de la cámara y después el peine.
8. Añadir buffer TBE de corrida con bromuro de etidio al 0,005 % hasta alcanzar la altura de los separadores y colocar las muestras con la micropipeta.
9. Conectar los electrodos a la fuente de poder y realizar corrida a un voltaje constante de 60 Voltios (debe determinar 60 mA inicialmente) durante 1 hora.

ANEXO D

PROCEDIMIENTO PARA EL CULTIVO DE *Ehrlichia canis* (Comunicación personal con la Dra. Jacqueline Dawson)

1. Descongelar y expandir las células no infectadas de la línea celular continua DH82.
2. Tener varios frascos de cultivo con células no infectadas listos, antes de descongelar el vial de células infectadas. Las células deben tener por lo menos una semana de cultivo; la monocapa debe estar completamente confluyente (fase estacionaria).
3. Colocar un vial de células DH82 infectadas con *E. canis* en agua caliente (50-60 °C). Hacer movimientos rotatorios mientras descongela el vial. Chequear el vial cada 15 segundos y cuando justamente quede un poquito de hielo dentro del vial, rápidamente introducir el vial dentro de un beaker lleno de etanol al 70% para esterilizar la superficie externa.
4. Inmediatamente transferir el contenido del vial a un tubo de centrifuga de 15 ml que contiene 10 ml de medio de cultivo. (La rapidez es muy importante, debido a que tan pronto como el vial sea descongelado debe eliminarse el Dimetil Sulfoxido (DMSO)).
5. Inmediatamente centrifugar a 61 x g durante 10 minutos.
6. Descartar el sobrenadante y añadir 5 ml de medio de cultivo fresco.
7. Resuspender suavemente las células y transferir la suspensión al frasco de cultivo con DH82 no infectadas.
8. Incubar a 37 °C (sin CO₂) durante 72 horas y hacer cambios del medio dos veces a la semana.
9. Después de las 72 horas extraer 3 ml de medio viejo y descartarlo y añadir 5 ml de medio fresco al frasco original.
10. A los tres días cambiar el medio de cultivo.
11. En el siguiente cambio de medio extraer una muestra del sobrenadante y determinar el porcentaje de células infectadas preparando un citocentrifugado. No desprender la monocapa ya que habrán suficientes células en el sobrenadante.
12. Cuando se haya determinado entre un 85 a un 95 % de células infectadas realizar pases a nuevos cultivos de células DH82 sanas y cuando el porcentaje de células infectadas esté entre un 60-70 % crioconservar.

ANEXO E

Valores de referencia de la hematología y temperatura corporal en perros

Determinación	Rango	Unidades
Hemoglobina	12-18 ^a	g/dl
Hematocrito	37-55 ^a	%
Plaquetas	150.000-500.000 ^a	Plaquetas/ μ l
Leucocitos	6.000-17.000 ^b	Leucocitos/ μ l
Neutrófilos	3.000-11.500 (60-77) ^b	Neutrófilos/ μ l (%)
Linfocitos	1.000-4.800 (12-30) ^b	Linfocitos/ μ l (%)
Eosinófilos	100-1.350 (2-10) ^b	Eosinófilos/ μ l (%)
Monocitos	150-1.350 (3-10) ^b	Monocitos/ μ l (%)
V.S.G.	0-12 ^b	mm/hora
Temperatura rectal	37,5-39,0 ^c	°C

^a = Sodikoff, 2001; ^b = Bush, 1999; ^c = Ruckebush *et al.*, 1994