

***Ehrlichia platys*: PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO Y USO DE LA TÉCNICA DE INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA (IFI) EN CANINOS Y HUMANOS**

***Ehrlichia platys*: Antigen Processing and Use of the Indirect Fluorescent Antibody Test (IFA) in Canines and Human**

Cruz María Arraga de Alvarado*

Omaira del C. Parra M.*

María Palmar**

Rosa E. Chango*

Mary Cruz Alvarado A.*

* Unidad de Investigaciones Clínicas

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad del Zulia. Apdo. 15232

Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

** Instituto de Investigaciones Biológicas

Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Apdo. 1522

Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

RESUMEN

Con la finalidad de preparar frotis de antígenos para la realización de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), un perro sano esplenectomizado fue inoculado con plasma rico en plaquetas (PRP), el cual contenía una cepa de *E. platys* y otro perro sin esplenectomizar se infectó en forma natural mediante picadura de garrapatas. Se modificó la técnica descrita por French y Harvey para la preparación del antígeno de *E. platys* y se obtuvieron frotis antígenos de excelente calidad. Se realizaron contajes plaquetarios, valoración de parasitemias y títulos de anticuerpos cada 7 días durante el período de estudio (3.5 y 3 meses respectivamente). Los títulos máximos obtenidos de anticuerpos anti-*E. platys* fueron 1:1600, estos títulos disminuían parcial o totalmente al aplicar tratamiento con Doxiciclina. Para la estandarización de la prueba se usaron, además de los sueros de los perros experimentales, 30 sueros de perros de la ciudad de Maracaibo positivos y negativos a *E. platys* en frotis de capa blanca. Diez y siete de ellos fueron negativos a IFI y trece positivos. Se utilizó el antígeno para evaluar un lote de 30 sueros humanos, a los cuales se les había observado *Ehrlichias plaquetarias* semejantes a *E. platys*; todos resultaron

negativos, concluyéndose que no existe reacción cruzada entre ellas. Así mismo, se demostró la presencia de *Ehrlichia platys* en las plaquetas del PRP de perro usando la técnica de microscopía de transmisión.

Palabras clave: *Ehrlichia platys*, inmunofluorescencia, IFI, caninos, humanos, microscopía electrónica.

ABSTRACT

In order to prepare antigen slides to perform the indirect fluorescent antibody test (IFA), a healthy splenectomized dog was inoculated I.V. with platelet rich plasma (PRP), containing an strain of *E. platys*. Another dog without splenectomy was naturally infected through tick's bite. The French and Harvey's technic for *E. platys* antigen slides was modified and excellent quality antigen slides were obtained. Platelet counts, parasitemia and anti-*E. platys* antibodies titles every seven days during the study (3,5 a 3 months respectively) were performed. The highest title obtained was 1:1600; title decrease partially or totally after Doxycycline treatment. Serum samples from the two experimental dogs and from 30 dogs from Maracaibo's city (negative and positive by buffy coat smears) were used to standardized the test. Seventeen of the serum samples were negatives to IFA test and thirteen were positives.

Antigen was used to test a group of 30 serum samples from humans that showed plaquetary ehrlichia similar to *E. platys*. All of them were negatives and then there is not a cross reactivity between them. *Ehrlichia platys* in platelets from dog PRP was demonstrated using transmission electron microscopy technic.

Key words: *Ehrlichia platys*, inmunofluorescent, IFA, canines, human, electron microscopy.

INTRODUCCIÓN

La Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina (TCIC) es una enfermedad causada por una rickettsia, la *Ehrlichia platys* reportada por Harvey y col. [12] en los Estados Unidos de Norteamérica.

Algunos autores consideran que es una enfermedad benigna [3,13,14], mientras que otros describen casos clínicos complicados [1,10,20], muchos de ellos con sintomatología muy semejante a la descrita para Ehrlichiosis Canina [1,11].

La TCIC ha sido transmitida experimentalmente por inyección intravenosa de sangre conteniendo *E. platys* durante el período de parasitemia [1,3,9,10,12,13,14]. En condición natural, probablemente es transmitida por picadura de garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) [13,14,18] y otros artrópodos [13,18], aunque no pudo demostrarse que la garrapata se mantuviera infectada por muchos días [18], tal como ocurre en el caso de la *Ehrlichia canis* [11,18]. La enfermedad se caracteriza por causar parasitemias y trombocitopenias subsecuentes, que ocurren a intervalos de una a dos semanas [10,12,13,14,20].

La parasitemia causada por la enfermedad ha sido usada como método de diagnóstico, en especial cuando las plaquetas infectadas se concentran al realizar un frotis de capa blanca; sin embargo, en momentos donde la parasitemia no está presente, el diagnóstico debe realizarse por demostración de anticuerpos anti-*Ehrlichia platys* usando la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) [13,14,15].

Así como los perros se ven afectados por Ehrlichias leucocitarias y plaquetarias, los seres humanos también pueden ser infectados por el género *Ehrlichia*. Desde 1986 se describe en seres humanos una enfermedad que inicialmente se creyó era causada por *Ehrlichia canis* y que posteriormente se evidenció que era causada por otra especie, la *Ehrlichia chaffeensis* [4]. Numerosas publicaciones se han realizado describiendo, clínica, hallazgos de laboratorio, métodos de diagnóstico y epidemiología de la enfermedad [4,6,7]. En un 85% de los casos humanos se ha demostrado la exposición a garrapatas o la picadura de estas [8]. En la Unidad de Investigaciones Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinaria de La Universidad del Zulia (UIC-FCV-LUZ) en Maracaibo-Venezuela, desde 1992 se ha estado observando en plaquetas humanas, cuerpos semejantes a los descritos para *Ehrlichia platys* en perros [2], aso-

ciados a la diversa sintomatología descrita en la literatura para la *Ehrlichia chaffeensis* [6,7,8].

Los objetivos de esta investigación fueron: preparar antígenos de *Ehrlichia platys* con una cepa de la región para el diagnóstico serológico; con los antígenos obtenidos aplicar la técnica de IFI a una población canina de la ciudad de Maracaibo, así como a un grupo de sueros humanos, a fin de comprobar si existe reacción cruzada entre la cepa de *Ehrlichia platys* y la presente en los casos humanos y utilizar la técnica de microscopía electrónica de transmisión para cerciorarse si el material plaquetario observado en microscopía de luz correspondía a *Ehrlichia platys*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Dos perros de la raza Bóxer, de la misma camada y de 8 meses de edad fueron empleados para la ejecución de este ensayo. Los animales presentaron valores hematológicos dentro de los límites normales; fueron serológicamente negativos a *Ehrlichia canis*, mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), usando como antígeno la cepa DH82 infectada con *Ehrlichia chaffeensis*, cedida gentilmente por Jaqueline Dawson, CDC (Center Disease Control) Atlanta., E.U.A.

Uno de los perros fue esplenectomizado, mientras que el otro se mantuvo intacto; a ambos diariamente se le tomaba una muestra de sangre con anticoagulante EDTA (Etilendiamino Tetraacetato de Sodio) y sin anticoagulante. A las muestras con anticoagulante se les realizaba hematología completa incluyendo el conteo plaquetario, para lo cual se utilizó el método de Oxalato de Amonio al 1%, en un microscopio con contraste de fase (Axioskop-Zeiss), tal como lo describe Schalm [17]. También se realizó la evaluación de la parasitemia en ambos perros mediante la observación de frotis sanguíneos teñidos. A las muestras sin anticoagulante se le extrajo el suero y se inactivó a 56°C por 30 minutos. Se aplicó la técnica de IFI, preparando diluciones de suero 1:10; 1:100 y luego hasta 1:12.800.

Inóculo

El inóculo fue obtenido de muestras de sangre de caninos de la ciudad de Maracaibo, recibidas en el Laboratorio de Diagnóstico Clínico de la Policlínica Veterinaria, Universidad del Zulia (LDC-LUZ); ellas contenían altas parasitemias de *Ehrlichia platys* a la observación de frotis sanguíneos teñidos. El plasma rico en plaquetas (PRP) fue separado y preservado con glicerol al 10%, en una solución de Buffer Fosfato de Sodio (PBS) pH 7.4, a mezclas iguales [12], así los inóculos fueron almacenados en nitrógeno líquido hasta su utilización.

Preparación del antígeno

Al perro esplenectomizado se le inyectó 3 ml de un inóculo de *Ehrlichia platys*, por vía intravenosa. Al otro perro no se

le esplenectomizó ni se le inoculó, adquiriendo el agente por exposición natural a garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*), al mantenerse en el mismo ambiente con su hermano, ya que en un clima cálido como el de la ciudad de Maracaibo es difícil el control de las mismas. Al inicio del estudio los perros estaban limpios de ellas, pero posterior a la inoculación ambos perros fueron observados parasitados por garrapatas, por lo que a los 16 días el perro no esplenectomizado mostró *E. platys*.

Varios intentos de preparación de antígenos se realizaron en un período de 98 días en el perro esplenectomizado y 52 días en el no esplenectomizado, mientras se realizaban ajustes a la técnica de French y Harvey [9]. Para controlar las parasitemias durante este período hubo la necesidad de utilizar Doxiciclina 200 mg cada 24 horas por 5-10 días.

Al alcanzar el pico de parasitemia en ambos animales, se recolectaron 100 ml de sangre de la vena yugular, utilizando tubos que contenían EDTA en forma líquida. Las muestras fueron centrifugadas (DAMON, IEC DIVISION) a 700 r.p.m. a temperatura ambiente durante 15 minutos, para obtener el plasma rico en plaquetas (PRP).

El PRP fue transferido a tubos plásticos de polietileno y centrifugados a 2500 r.p.m., por 10 minutos a temperatura ambiente, obteniéndose de ésta manera el tapón plaquetario. El plasma sobrenadante fue separado del tapón plaquetario para su inactivación a 56°C, se centrifugó para separar el fibrinógeno, fue envasado en alícuotas y luego congelado a -70°C (RE-VCO) con la finalidad de realizar futuras determinaciones y las titulaciones correspondientes.

El tapón plaquetario fue resuspendido en Buffer Fosfato de Sodio (PBS) pH 7.4, a un volumen igual al del tapón, centrifugándose a 2500 r.p.m., por 10 minutos a temperatura ambiente y descartando el sobrenadante; este procedimiento se llevó a cabo dos veces. Al tapón plaquetario final se le agregó Buffer Fosfato de Sodio (PBS) pH 7.4, hasta ajustar el conteo plaquetario a 125.000 plaquetas/ μ l.

Se dispensaron 5 μ l de la suspensión final en láminas portaobjetos, estériles, que contenían 12 celdas de 5 mm de diámetro (Cel-Line Associates INC, New Jersey, U.S.A.); las láminas fueron secadas en campana de flujo laminar y fijadas por inmersión en acetona absoluta por 10 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente se secaron y se almacenaron en porta láminas plásticos a -70°C.

Estandarización de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Las láminas con los antígenos fueron retiradas del congelador y descongeladas en una campana de flujo laminar por 30 minutos. Los sueros fueron descongelados a temperatura ambiente y diluidos. Con una pipeta multicanal se dispensaron 20 μ l de los sueros diluidos a las celdas correspondientes de la lámina antígeno. Las láminas fueron incubadas a 37°C, por 30

minutos en una estufa humidificada, lavadas 2 veces con PBS pH 7.4 a 4°C y secadas.

Una vez secas, se agregó 20 μ l de conjugado de Conejo Anti-inmunoglobulina G de perro con Isotiocianato de Fluoresceína (Kirkergaard & Perry Laboratories, INC) a una dilución de 1:40. Luego fueron incubadas a 37°C por 30 minutos en una estufa humidificada, se lavaron dos veces con PBS pH 7.4 a 4°C y por último con agua destilada a 4°C.

Nuevamente fueron secadas y montadas con glicerol para su observación en un microscopio con luz ultravioleta (Axioskop-Zeiss), bajo el objetivo de inmersión 100x.

Detección de anticuerpos en caninos y humanos

Para la estandarización de la técnica se utilizaron 2 sueros de referencia cedidos por la microbióloga Jacqueline Dawson, del C.D.C. de Atlanta, USA, negativos a *E. chaffeensis*, *E. ewingii* y a *E. platys*; ellos fueron diluidos 1:10, como sueros positivos se usaron 5 procedentes de perros detectados positivos mediante frotis sanguíneo. Ellos fueron diluidos 1:10 y 1:100 tal como lo recomienda Franch y Harvey [9].

Se utilizó también un suero de referencia (C.D.C.) positivo a *E. chaffeensis* para demostrar si existía o no cruce antigénico con el antígeno producido.

Para realizar la curva de titulación de anticuerpos anti-*Ehrlichia platys* en los perros experimentales, se escogieron sueros de los recolectados durante el período de estudio. Ellos fueron diluidos 1:10; 1:100 y diluciones dobles hasta llegar a 1:12.800.

Se procesaron también 30 sueros de caninos que llegaron al LDC-LUZ. A estos caninos se les realizó un frotis de capa blanca, el cual fue teñido con el colorante rápido Dip Quick Stain (Jorgensen Laboratories INC-Co), con el propósito de determinar la presencia o ausencia de la *Ehrlichia platys*; se aplicó la técnica de IFI en estos sueros a diluciones de 1:10 y 1:100. De esta forma se evaluó la sensibilidad de la prueba.

Se procesaron 30 muestras de sueros humanos inactivados a 56°C, provenientes de personas que habían resultado positivas a Ehrlichias plaquetarias, en frotis sanguíneos de capa blanca. Dos sueros fueron procesados de cada persona (agudo y convaleciente), estos sueros fueron diluidos 1:10 y 1:100, usando conjugado de conejos anti-inmunoglobulinas G humana, para determinar si existía reacción cruzada con *Ehrlichia platys* de perro. Esto nos permitió demostrar la especificidad del agente.

Demostración de *Ehrlichia platys* usando el microscopio electrónico de transmisión

Se obtuvo sangre en un tubo de 5 ml conteniendo EDTA como anticoagulante. Se centrifugó a 700 r.p.m. por 15 minutos para obtener P.R.P., este fue transferido a un tubo de centrifuga, se le añadió igual cantidad de glutaldehído al 0.1% y se

incubó a 37°C por 10 minutos. El P.R.P. fue centrifugado de nuevo a 2500 r.p.m. por 10 minutos, para obtener el tapón plaquetario, se eliminó el sobrenadante y se incluyó el tapón con igual cantidad de glutaldehído al 3%, permaneciendo al menos 72 horas en refrigeración (4°C). El material incluido fue llevado al Instituto de Investigaciones Biológicas de la Facultad de Medicina LUZ, donde se continuó con el procedimiento convencional para microscopía electrónica de transmisión. Los cortes finos fueron observados al microscopio electrónico y varias microfotografías fueron tomadas para demostrar la presencia de la *Ehrlichia*.

RESULTADOS

Se obtuvieron 479 frotis de antígenos del perro esplenectomizado cuando la parasitemia alcanzó el 59.1%, con un conteo plaquetario de 147.000 plaquetas/ μ l y 125 frotis del no esplenectomizado con parasitemia de 97.1% y un conteo plaquetario de 46.000 plaquetas/ μ l. Todos fueron de excelente calidad, evidenciados al teñirlos con Dip Quick Stain, FIG. 1. Se utilizó la técnica de I.F.I. con los sueros de referencia; con los sueros negativos se observaron las plaquetas con cuerpos verde opaco. Con los sueros positivos se observaron las plaquetas con cuerpos fluorescentes de color verde manzana brillante.

Al realizar la técnica de IFI con los sueros obtenidos durante el estudio, en ambos perros se observó claramente una

reacción de positividad al detectar numerosas plaquetas con cuerpos elementales o mórulas (1-4) fluorescentes, FIG. 2.

La demostración de que los cuerpos fluorescentes en las plaquetas, observadas en la prueba de I.F.I., eran *E. platys*, se logró con los frotis sanguíneos teñidos en los períodos de alta parasitemia, FIG. 3, donde con toda claridad se observaron *E. platys* en forma de cuerpos elementales o mórulas parasitando las plaquetas. De igual forma por microscopía electrónica se pudo evidenciar plaquetas que contenían grandes vacuolas en cuyo interior se observaron cuerpos elementales de *E. platys* aislados o en grupos. Algo característico del género *Ehrlichia* es la observación de una doble membrana rodeando al agente [12], quien muestra formas redondeadas, alargadas o arriñonadas, tal como puede ser observado en la FIG. 4 y 5.

Se realizó titulación de anticuerpos anti-*Ehrlichia platys* en los dos perros, FIG. 6. Los títulos de anticuerpos aumentaron durante la infección, pero al aplicar el tratamiento descendieron en ocasiones en forma total y en otras parcialmente. Ante nuevos retos o al suspender los tratamientos los títulos se incrementaron alcanzando un máximo de 1:1600.

Los altos niveles de anticuerpos se presentaron por períodos muy cortos, observándose que en la primera infección los niveles de anticuerpos alcanzaron títulos de 1:400, mientras que en las siguientes se duplicaron o triplicaron.

La TABLA I muestra el número de perros positivos y negativos a *Ehrlichia platys* utilizando el frotis de capa blanca y la



FIGURA 1. FROTIS DE ANTÍGENO DE UN CANINO ESPLENECTOMIZADO TEÑIDO CON DIP QUICK STAIN. SE OBSERVAN VARIAS PLAQUETAS CONTENIENDO CUERPOS DENSOS DE COLOR MORADO QUE CORRESPONDEN A MÓRULAS DE *Ehrlichia platys*. 1250X.

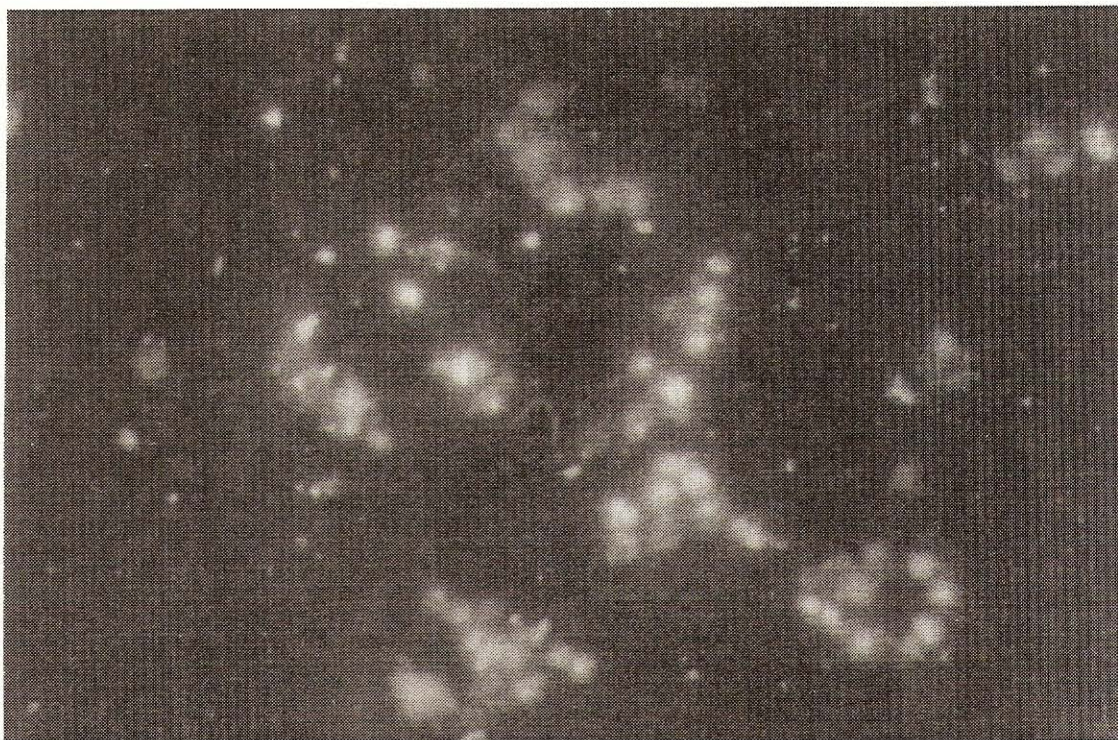


FIGURA 2. FROTIS DE ANTÍGENO DE UN CANINO INFECTADO CON *Ehrlichia platys*. NÓTESE VARIAS PLAQUETAS CON MÓRULAS (1-3) DE COLOR VERDE MANZANA BRILLANTE EVIDENCIADAS USANDO LA TÉCNICA DE IFI, ACOMPAÑADAS POR ALGUNAS PLAQUETAS NEGATIVAS A *E. platys*. 1250X

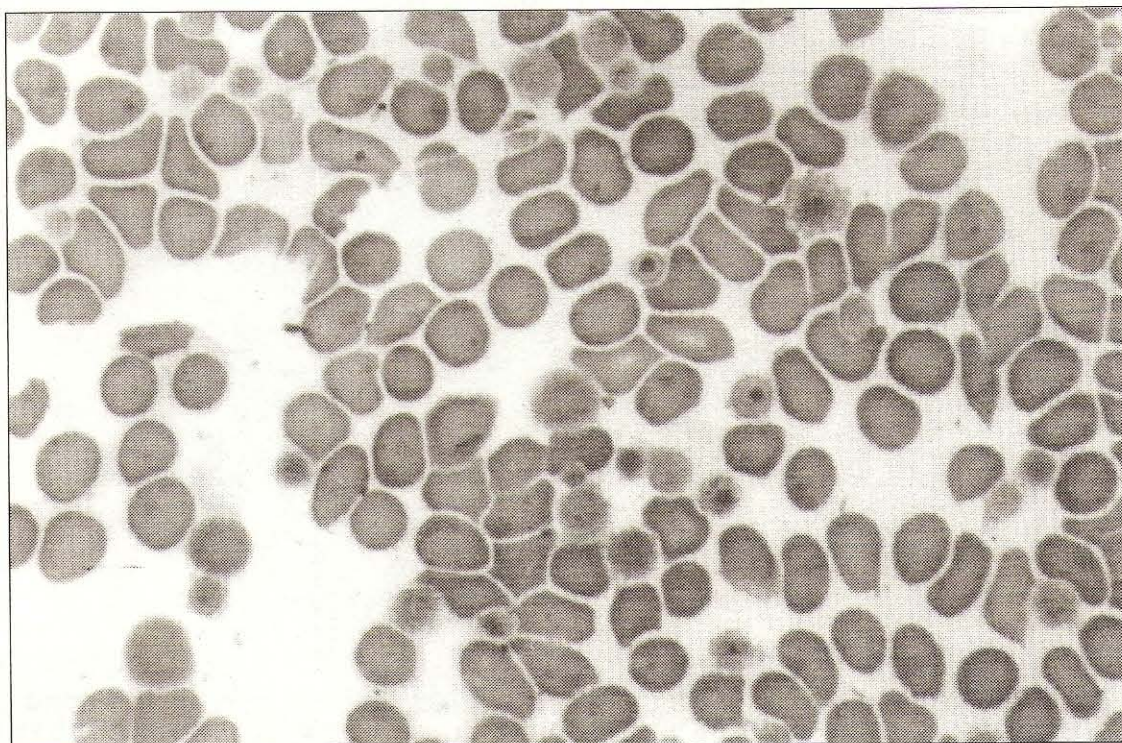
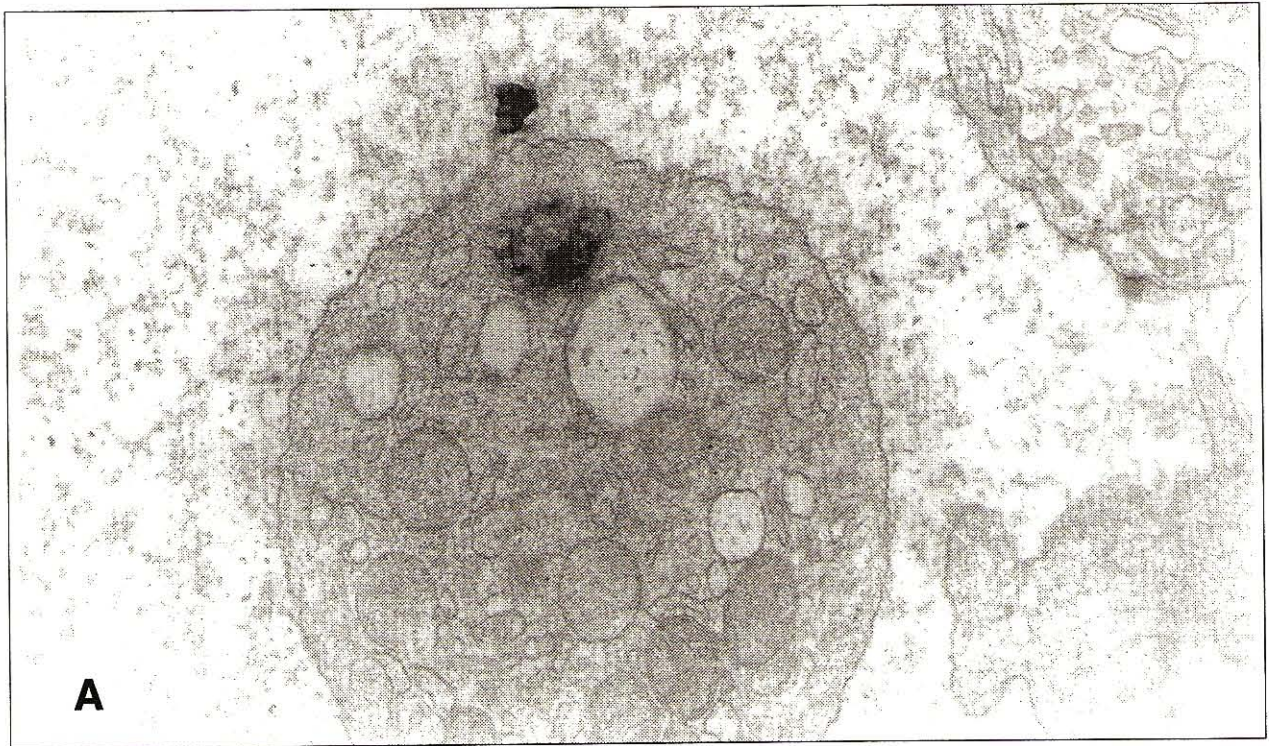
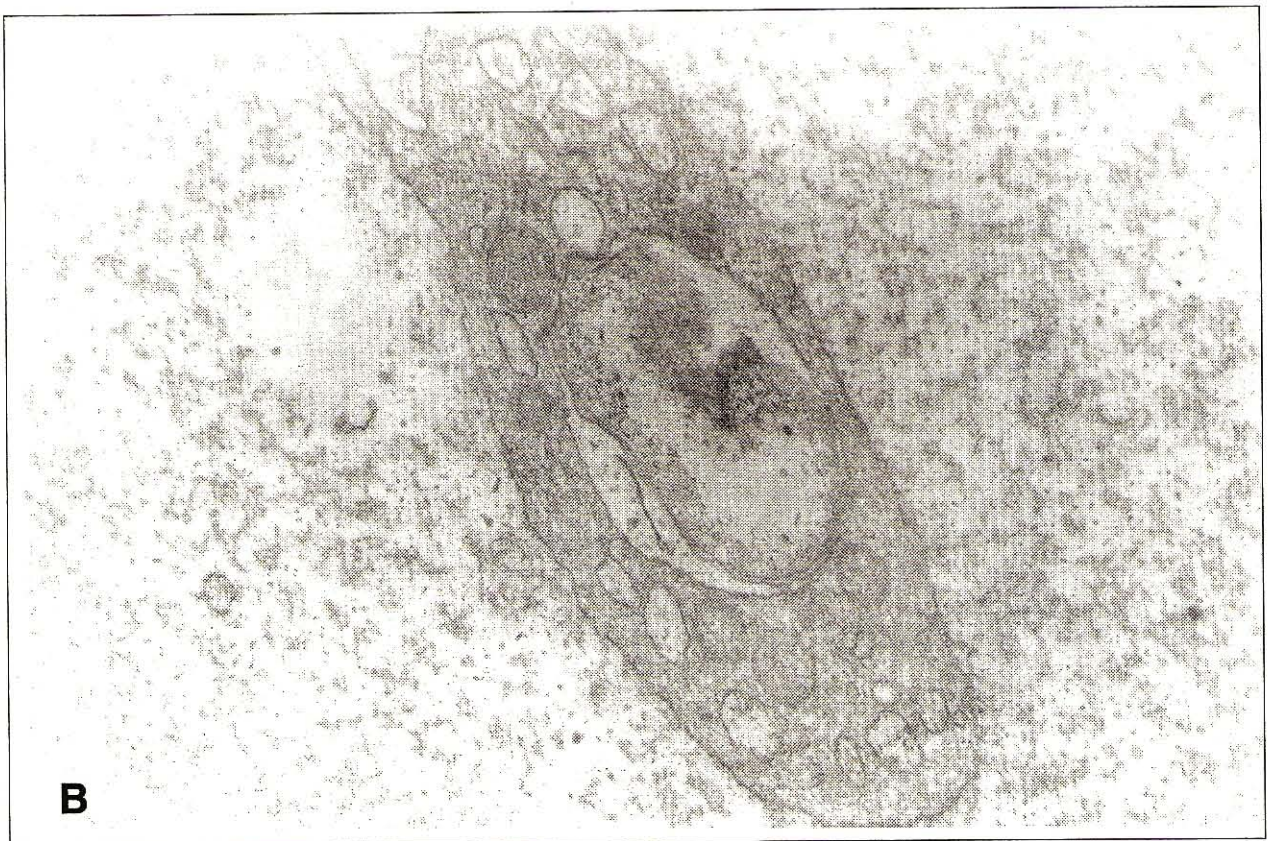


FIGURA 3. FROTIS DE SANGRE TEÑIDO CON DIP QUICK STAIN DONDE SE PUEDEN OBSERVAR VARIAS PLAQUETAS CON *E. platys* EN FORMA DE CUERPOS INICIALES (A) Y MÓRULAS (B). 1250X.



A



B

FIGURA 4. MICROGRAFÍAS DE PLAQUETAS DEL PERRO ESPLENECTOMIZADO. (A) PLAQUETA NORMAL, DONDE PUEDEN OBSERVARSE VACUOLAS, SÁCULOS, MITOCONDRIAS Y GRÁNULOS ALFA, TODO INCLUIDO EN EL CUERPO DE LA PLAQUETA, RODEADO POR LA MEMBRANA PLASMÁTICA BIEN DELIMITADA (ELECTRODENSE). (B) PLAQUETA MOSTRANDO UN CUERPO ELEMENTAL DE *E. platys* EN DIVISIÓN (FORMA ARRIÓNADA) INCLUIDO DENTRO DE UNA VACUOLA. 22.000 X

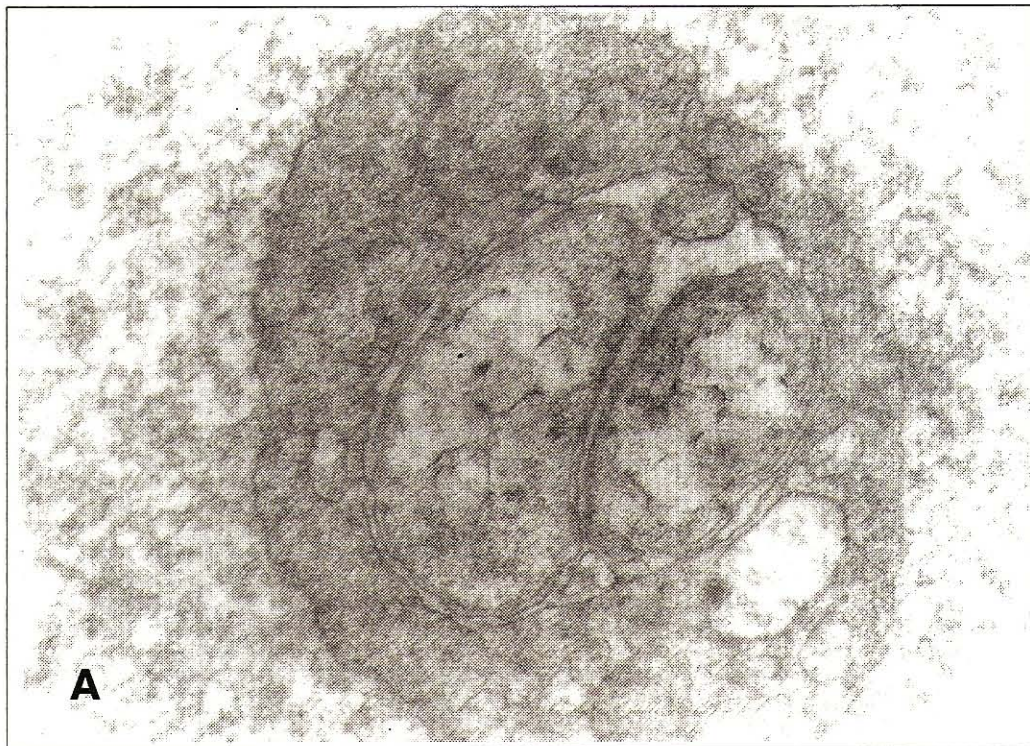


FIGURA 5. MICROGRAFÍAS DE PLAQUETAS DEL PERRO ESPLENECTOMIZADO E INFECTADO CON *E. platys*. (A) PLAQUETA DISCOIDAL DONDE SE OBSERVA MÓRULA CONSTITUIDA POR TRES CUERPOS ELEMENTALES, DOS GRANDES Y ALARGADOS CON SU CARACTERÍSTICA DOBLE MEMBRANA (FLECHA) Y UNO PEQUEÑO, TODOS INCLUIDOS EN UNA VACUOLA. (B) PLAQUETA MOSTRANDO VACUOLA CON TRES ORGANISMOS REDONDEADOS, BIEN DELIMITADOS POR SU DOBLE MEMBRANA. SE PUEDE TAMBIÉN OBSERVAR UNA ESTRUCTURA REDONDEADA, LIGERAMENTE ELECTRODENSA QUE PRESUMIBLEMENTE CORRESPONDE A UN CUERPO ELEMENTAL. 28300X.

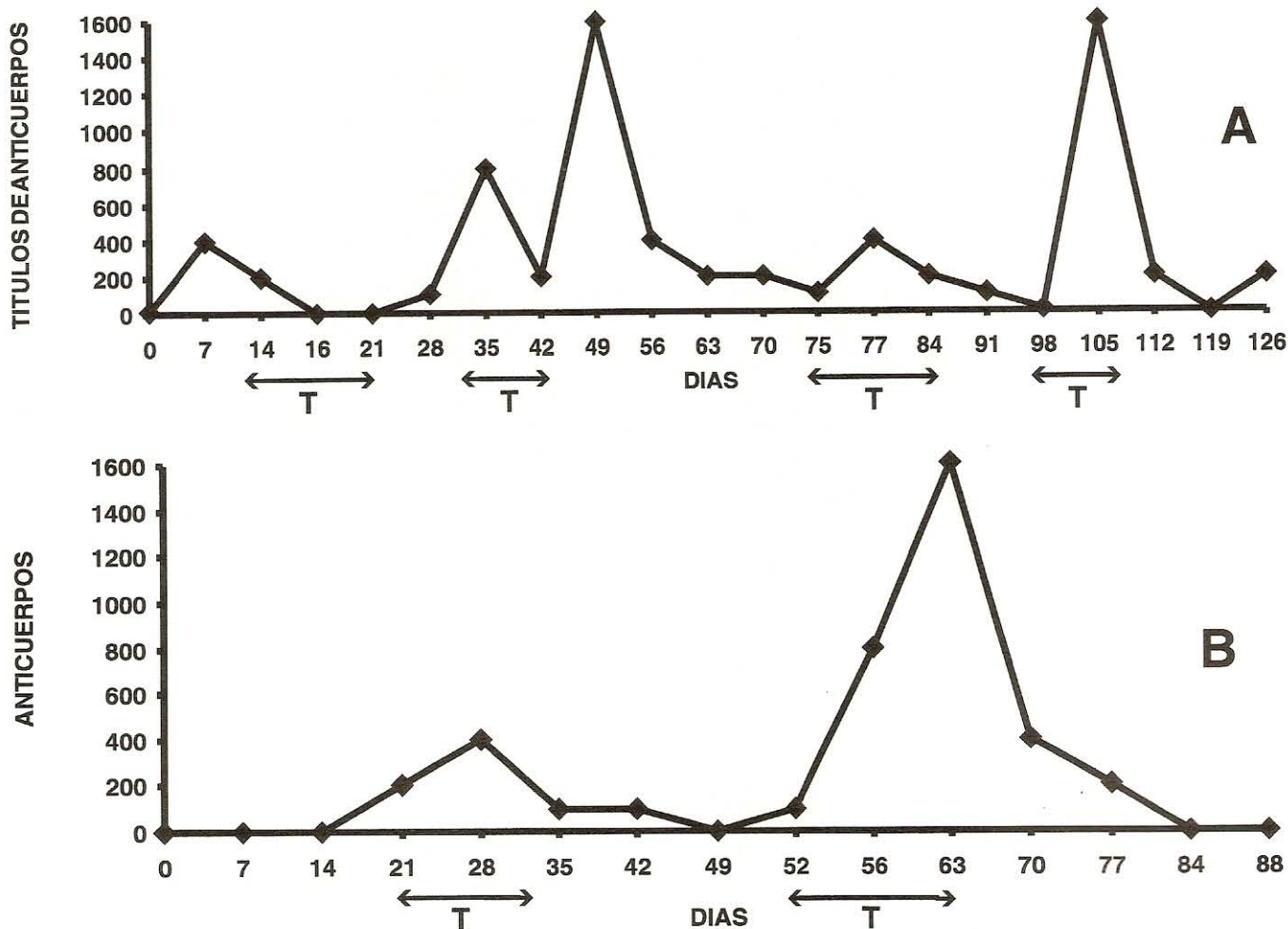


FIGURA 6. SECUENCIA DE TÍTULOS DE ANTICUERPOS POR IFI, EN UN CANINO ESPLENECTOMIZADO (A), Y NO ESPLENECTOMIZADO (B), INFECTADOS CON *Ehrlichia platys*. T: TRATAMIENTO CON DOXICICLINA.

técnica de IFI como métodos de diagnóstico. De un total de 30 perros evaluados, 11 fueron negativos a frotis sanguíneo e IFI; cinco (5) fueron negativos a frotis sanguíneos, pero tenían anticuerpos (positivos a IFI) y 6 fueron positivos a frotis sanguíneos y negativos a IFI. Un total de 8 fueron positivos con ambas técnicas.

Ninguno de los 30 sueros humanos donde se observaron Ehrlichias plaquetarias en frotis, resultó positivo a la técnica de IFI, usando como antígeno nuestro preparado de *Ehrlichia platys*.

DISCUSIÓN

French y Harvey [9] describen en su técnica de preparación de antígeno, el uso de sangre citratada, de igual manera citan el centrifugar el PRP a 450x g por 3 minutos y posterior-

TABLA I

***Ehrlichia platys*: ESTUDIO SEROLÓGICO Y DE FROTIS SANGUÍNEO DE 30 CANINOS DE LA CIUDAD DE MARACAIBO**

	Positivo a IFI	Negativo a IFI	Total
Positivo a Frotis	8 (57.1%)	6 (42.8%)	14
Negativo a Frotis	5 (31.2%)	11(68.7%)	16
Total	13 (43.3%)	17 (56.7%)	30

mente a 200x g por 10 minutos. Siguiendo ésta técnica no se obtuvo éxito en la preparación del antígeno, por lo que se debió hacer modificaciones; así se utilizó sangre con EDTA, ya que las plaquetas con citrato se agregan y al usar la técnica de IFI se hace difícil visualizar las mórulas dentro de las plaquetas, ya que ellas pueden ser confundidas con precipitado de fluoresceína.

La primera centrifugación a 1600 r.p.m. (450x g), conducía al asentamiento de las plaquetas sobre los leucocitos y a la disminución de su número en el PRP, con un pobre tapón plaquetario final y escasas plaquetas parasitadas. La segunda centrifugación a 1000 r.p.m. (200x g) dejaba muchas plaquetas en suspensión con las consecuencias ya citadas.

Al reducir la primera centrifugación a 700 r.p.m. por espacio de 15 minutos se logró una mayor concentración de plaquetas en el plasma sobrenadante, las cuales fueron separadas y asentadas usando una posterior centrifugación a 2500 r.p.m. durante 10 minutos. Esto permitió que con la misma cantidad de sangre obtenida en los primeros intentos de preparación de antígenos, se lograra una cantidad mayor de plaquetas parasitadas, pudiéndose obtener un mayor número de láminas antígenos, aún cuando los perros mostraban contajes plaquetarios bajos.

La misma técnica dio muy buenos resultados para la preparación del pelet usado para microscopía electrónica. Las micrografías de las *E. platys* de los perros del estudio son semejantes a las mostradas por French y Harvey [9], Harvey y col. [12] y por Harvey [13] en sus reportes.

En el perro esplenectomizado, los contajes plaquetarios siempre fueron más elevados que en el no esplenectomizado, ésto debido a que en el último posiblemente ocurrió secuestro plaquetario a nivel del bazo, como ha sido descrito con anterioridad [11] y a la destrucción de gran número de plaquetas infectadas (97,1%), llegando así los contajes plaquetarios a un mínimo de 7.000 plaquetas/ μ l. después de cada parasitemia; una vez iniciado el tratamiento hubo recuperación del contaje plaquetario, similar a lo descrito por Igual y col. [16]. Concluida la fase experimental, los perros fueron tratados con Doxiciclina 10 mg/Kg cada 12 horas, por 15 días, tal como lo cita Igual y col. [16] para *Ehrlichia canis*, no observándose parasitemia en los posteriores chequeos (15 y 30 días post-tratamiento); así se considera que el tratamiento en esta forma, es más efectivo que el de 10 mg/Kg/día, citado con anterioridad [11], el cual fue el utilizado durante el período experimental.

Al estudiar las curvas de títulos de anticuerpos de los perros experimentales de French y col. [9], se puede observar que los títulos se incrementaron a los 12-15 días y se mantuvieron elevados hasta los 60 días, aun cuando las parasitemias se encontraban en rangos menores a 10%.

No ocurrió así con los perros del estudio, ya que en ambos los títulos de anticuerpos se elevaron con las parasitemias que siempre fueron altas, y bajaron bruscamente con los trata-

mientos. Esto hace pensar que el mantenimiento de los títulos está supeditado a la presencia de la *Ehrlichia* en sangre o en los tejidos, y que puede ser modulada con el tratamiento. Algo semejante pero menos acentuado, observaron Igbal y col. [16] en su estudio de Doxiciclina en *Ehrlichia canis*, por lo que recomiendan estudios de IFI posterior al tratamiento para determinar la efectividad del mismo.

Las pruebas negativas en dos oportunidades en el perro esplenectomizado y en una ocasión en el no esplenectomizado, después de la aplicación del tratamiento, indican que el tratamiento, aunque a la dosis tradicional (10 mg/Kg/1 vez al día), fue efectivo. La parasitemia, luego del reto natural o experimental, expresa la poca resistencia del sistema inmunológico al agente rickettsial, lo cual hace pensar que existe una activación de la inmunidad humoral, pero los anticuerpos no ofrecen protección ante nuevos retos.

Aunque Simpson y col. [18] demostraron con sus estudios que el *Rhipicephalus sanguineus* posiblemente no sea el transmisor de la *Ehrlichia platys*, la experiencia de más de 10 años con casos de TCIC y la observación del perro no esplenectomizado, hace pensar que al menos en Venezuela la garrapata es el transmisor mecánico de la enfermedad, aunque también se ha observado 2 casos donde los animales se encontraban infectados con pulgas (*Ctenocephalides canis*) y los dueños negaron la infestación con garrapatas.

En los 30 perros estudiados de la Policlínica Veterinaria de LUZ se consiguió un grupo en fase aguda con altas parasitemias y sin anticuerpos; otros, con parasitemia leve a moderada y con títulos de anticuerpos, así como 5 (16,6%) animales sólo positivos a IFI, lo que indicaría que la parasitemia era imperceptible. Once (11) del total (36,6%) se encontraron negativos a ambas pruebas. Al igual que en el estudio de Louisiana realizado por Hoskins y col. [15], fue demostrado que más del 50% de los perros muestreados en Maracaibo, fueron positivos a *Ehrlichia platys*. En un anterior estudio en la misma ciudad [1], sólo 14,5% de 55 perros estudiados estaban infectados con *Ehrlichia platys*, mientras que 83,6% lo estaban a *Ehrlichia canis*. En ese estudio la detección de *Ehrlichia* se realizó sólo utilizando frotis de capa blanca. En el año 1994, en el mismo laboratorio se encontró que el 51,5% de las muestras procesadas, eran positivas a *Ehrlichia platys* y en 1995 el 58,8% (datos no publicados).

Dawson y col. [5] demostraron la susceptibilidad de perros a la infección con *Ehrlichia chaffeensis*, aunque ellos no mostraban signos clínicos y la importancia del perro como reservorio de este agente.

El observar cuerpos semejantes a *Ehrlichia platys* en plaquetas de seres humanos condujo a investigar si era posible que fueran los mismos; que los perros pudieran ser reservorios de la enfermedad, pero la negatividad en las pruebas de IFI llevó a la conclusión que las *Ehrlichias plaquetarias* humanas son diferentes a las *Ehrlichia platys*. Estos resultados difieren a los de otros autores en nuestro país [19], quienes publicaron resul-

tados preliminares de una investigación. Así, Tami y col. [19] citan el utilizar una técnica de IFI en tubo, donde el antígeno se preparó con leucocitos y plaquetas de capa blanca de sangre de perro y se enfrentó a sueros humanos. Textualmente ellos expresan "La prueba tentativa de inmunofluorescencia indirecta, realizada en suspensión celular, detectó inclusiones en plaquetas y en algunos linfocitos". Ellos no citan cuántas de las 53 personas, estudiadas por frotis, resultaron positivas; es extraño que la reacción sea en ambas células cuando es conocido que en perros la *Ehrlichia canis* y la *Ehrlichia platys*, no reaccionan en forma cruzada [11]. En el presente estudio, usando antígeno de *Ehrlichia platys*, ninguno de los 30 pacientes humanos resultó positivo, como tampoco ocurrió con un total de 14 muestras enviadas a analizar en Norteamérica a través la microbióloga Jacqueline Dawson del CDC de Atlanta. En el estudio de Tami y col. [19], se cita también la presencia de cariorrhesis tanto en granulocitos como en linfocitos infectados con *Ehrlichia* en perros y humanos, lo cual no ha sido observado en la gran cantidad de frotis evaluados en animales y humanos en el LDC-LUZ en los últimos quince años, ni es reportado en la literatura estudiada [1,6,9,11,13,14].

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La mejor concentración antigénica se obtuvo modificando la técnica de French y Harvey [9] en cuanto al uso de EDTA como anticoagulante, centrifugación a 700 r.p.m. para obtener P.R.P. y a 2500 r.p.m para obtener el tapón plaquetario.

- Se demostró mediante microscopía electrónica que el antígeno obtenido correspondía a *E. platys*.

- El antígeno obtenido tuvo una buena sensibilidad, reaccionando con facilidad a los sueros de referencia positivos y negativos.

- El antígeno es específico para *E. platys*, ya que resultó negativo al suero de referencia positivo a *E. chaffeensis* y a los sueros procedentes de personas positivas a *Ehrlichias plaquetarias*.

- La Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina (TCIC) es una enfermedad bastante común en Maracaibo.

- La prevalencia de *E. platys* en las muestras que se procesan en el LDC-LUZ es mayor de 50%.

- Se observó una mayor parasitemia en el perro no esplenectomizado pero con un conteo plaquetario muy bajo. Lo contrario sucedió en el perro esplenectomizado.

- Se corroboró la importancia de la técnica de IFI para evaluar la efectividad del tratamiento contra *E. platys*.

- Las garrapatas son agentes importantes en la transmisión de la *E. platys*.

- Las *Ehrlichias plaquetarias* son morfológicamente semejantes en caninos y humanos, pero serológicamente no existe entre ellas reacción cruzada.

- Se recomienda continuar realizando estudios morfológicos mediante microscopía electrónica, además de estudios inmunológicos, con la finalidad de aclarar las dudas que existían sobre la presencia de *Ehrlichias plaquetarias* en humanos.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento del proyecto y a la División de Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias por darnos su apoyo. A la Policlínica Veterinaria de la Universidad del Zulia por prestarnos sus instalaciones para el ensayo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Arraga de Alvarado, C. Ehrlichiosis Canina en Maracaibo, Estado Zulia-Venezuela: reporte de 55 casos. Revista Científica. Universidad del Zulia. 2(2):41-52. 1992.
- [2] Arraga de Alvarado, C.; Montero de Ojeda, M.; Bernardoni, A.; Anderson B.E. y Parra, O. Ehrlichiosis humana: reporte del primer caso en Venezuela. Investigaciones Clínicas. Universidad del Zulia, 37(1):35-49. 1996.
- [3] Baker, D.C.; Gaunt, S.D. and Babin, S.S. Anemia of inflammation in dogs infected with *Ehrlichia platys*. American Journal of Veterinary Research. 49(7):1014-1016. 1988.
- [4] Dawson, J.; Fishbein, D.; Eng, T.; Redus, M. and Greene, N. Diagnosis of human ehrlichiosis with the indirect fluorescent antibody test; kinetics and specificity. The Journal of Infectious Diseases. 162:91-95. 1990.
- [5] Dawson, J. and Ewing, S.A. Susceptibility of dogs infected with *Ehrlichia chaffeensis*, causative agent of human ehrlichiosis. American Journal of Veterinary Research. 53(8):1322-1327. 1992.
- [6] Dumler, J.S.; Dawson, J. and Walker, D.H. Human Ehrlichiosis: Hematopathology and Immunohistologic detection of *Ehrlichia chaffeensis*. Human Pathology. 24(4):191-396. 1993.
- [7] Eng, T.R.; Harkess, J.R.; Fishbein, D.B.; Dawson, J. E.; Greene, C. N.; Redus, M. A.; Satalowich, F. T. Epidemiologic, Clinical and Laboratory findings of human ehrlichiosis in the United States. Journal of the American Medical Association. 264(17): 2251-2258. 1990.
- [8] Everett, E.D.; Evans, K.A.; Henry, R.B. and Mc Donald, G. Human Ehrlichiosis in Adults after Tick Exposure.

- Diagnosis using Polimerase Chain Reaction. *Annal of Internal. Medicine.* 120: 730-735. 1994.
- [9] French, T.W. and Harvey, J.W. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. *American Journal Veterinary Research.* 44(12):2407-2411. 1993.
- [10] Glaze, M.B.; Gaunt, S.D. and Babin, S.S. Uveitis Associated with *Ehrlichia platys* infection in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 189:916-917. 1986.
- [11] Greene, C.E. and Harvey, J.W. Canine Ehrlichiosis. *Clinical Microbiology and Infections Diseases of Dog and Cat.* W.B. Saunders. Co. Philadelphia: 545-561. 1984.
- [12] Harvey, J.W.; Simpson, R.M. and Gaunt, S.D. Cyclic Thrombocytopenia induced by a Rickettsia like agent in dogs. *Journal Infection Diseases.* 137(2):182-188. 1978.
- [13] Harvey, J.W. Infección por *Ehrlichia platys* (Trombocitopenia Cíclica Infecciosa en Perros). *Enfermedades Infecciosas en perros y gatos.* Editado por Greene. Interamericana Macgraw-Hill. Primera edición en español. México: 435-439. 1990.
- [14] Hibler, S.C.; Hoskins, J.D. and Greene, C.E. Rickettsial infections in dogs. Part II. Ehrlichiosis and Infection Cyclic. Thrombocytopenia. *Comp. Cont. Ed.* 106(8):106-114. 1986.
- [15] Hosking, I.D.; Breitschwerdt, E.B.; Gaunt, S.D., French, T.W. and Bugdorfer, W. Antibodies to *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia platys* and spotted fever group rickettsiae in Louisiana dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 2(2):55-59. 1988.
- [16] Igbal, Z. and Rikihisa, Y. Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after Doxycycline treatment. *Journal of Clinical Microbiology.* 32(7):1644-1649. 1994.
- [17] Schalm, O.W. and Jain, N.C. *Veterinary Hematology.* Lea & Febiger. Fourth edition. Philadelphia: 20-86. 1986.
- [18] Simpson, R.M.; Gaunt, S.D.; Hair, J.A.; Kocan, K.M.; Henk, W.G., Casey, H.W. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potencial biologic vector of *Ehrlichia platys*. *American Journal Veterinary Research.* 52(9): 1537-1541. 1991.
- [19] Tami, I.; García, F.; Tami, M. y Arcia, R. Ehrlichiosis en animales y humanos en Venezuela. *Acta Científica.* SVBE. 3(1):17-24. 1994.
- [20] Wilson, J.F. *Ehrlichia platys* in a Michigan dog. *Journal of the American Animal Hospital Association.* 28:381-383. 1992.