

Diagnóstico serológico y molecular de Ehrlichiosis humana en pacientes con sintomatología clínica compatible con la enfermedad en el estado Zulia Venezuela 2004-2005

Serological and Molecular Diagnosis of Human Ehrlichiosis in Patients with Clinical Manifestations Associated with the Disease in Zulia, Venezuela, 2004-2005

Castro-Morales, Mirtha¹ y Arocha, Francisco^{2*}

¹Médico Cirujano. Cursante de la Maestría de Microbiología.

²Médico Cirujano. Cátedra de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela

* arosan4@hotmail.com

Resumen

La Ehrlichiosis humana es una enfermedad zoonótica, transmitida al hombre por la picadura de garrapatas del perro y pocas veces del venado. *E. chaffeensis* es el agente causal más relacionado con la Ehrlichiosis Humana, sin embargo, la ehrlichiosis en humanos puede ser causada por ehrlichias propias de los caninos como *E. canis* y *E. ewingii*. En 1992, en el estado Zulia se presenta el primer caso de Ehrlichiosis Humana, en una lactante de 17 meses de edad, en quien se detectaron anticuerpos frente a *E. chaffeensis*. El objetivo de esta investigación fue estudiar la presencia de infección por *Ehrlichia* spp., en suero y sangre total de 30 sujetos con clínica sugestiva de esta patología. Se utilizaron las técnicas de IFI y ensayo nested PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), usando primers derivados de la secuencia genética que codifica el ARN ribosomal 16S de *Ehrlichia* spp., que proporcionan información de género más no de especie, debido a que se necesitan primers de género que pusieran detectar Ehrlichias en cualquier huésped. Ninguna de las muestras fue positiva en la prueba IFI, no evidenciándose anticuerpos para *Ehrlichia* spp. El ensayo nested PCR de las muestras sanguíneas no mostró amplificación de las secuencias seleccionadas del gen del ARN ribosomal 16S en ninguna de las muestras. Los datos obtenidos no ponen en evidencia la infección por *Ehrlichia* spp. en los pacientes estudiados.

Palabras clave: Ehrlichiosis humana, *Ehrlichia chaffeensis*, IFI, PCR.

Recibido: 23-02-12 / Aceptado: 20-06-12

Abstract

Human Ehrlichiosis is a zoonotic disease transmitted to humans through the bite of dog and occasionally, deer ticks. *E. chaffeensis* is the most common etiological agent related to human Ehrlichiosis; however, human Ehrlichiosis can be caused by canine ehrlichias such as *E. canis* and *E. ewingii*. In 1992, in the State of Zulia, the first case of human Ehrlichiosis appeared in a 17-month-old infant, in whom antibodies against *E. chaffeensis* were detected. The aim of this research was to study the presence of *Ehrlichia* spp. infection in the serum and whole blood of 30 persons with clinical symptoms associated with the disease. This was accomplished through techniques of indirect immunofluorescence and nested polymerase chain reaction assay (nested PCR), using primers derived from the genetic sequence that codify the ribosomal RNA 16S of *Ehrlichia* spp., which give information regarding gender but not species; due to this, gender primers are needed that could detect Ehrlichias in any host. None of the samples in the IFI assay was positive; no antibodies for *Ehrlichia* spp. were in evidence. The nested PCR test did not show amplification of the target sequence. The data did not support the evidence of *Ehrlichia* spp. infection in the patients studied.

Keywords: Human Ehrlichiosis, *Ehrlichia chaffeensis*, IFI, PCR.

Introducción

Las Ehrlichias, son bacterias Gram negativas intracelulares obligadas, pleomórficas con frecuencia esferoide u ovoides, que se establecen en células del sistema retículo-endotelial: monocitos, linfocitos, neutrófilos y plaquetas, produciendo mórulas intracitoplasmáticas, éstas últimas definidas como el acumulo intracitoplasmático de las bacterias, llegando a formar una mórula más de 40 microorganismos (22).

La Ehrlichiosis Humana es una enfermedad infecciosa, no contagiosa, zoonótica relacionada directamente con la Ehrlichiosis canina o Pancitopenia Tropical Canina, enfermedad causada por una rickettsia, llamada *Ehrlichia canis*, transmitida por la picadura de la garrapata café del perro, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ehrlichia canis* fue el primer microorganismo en ser descubierto en caninos (1935); posteriormente se han descubierto otras especies, como: *E. equi*, *E. bovis*, *Neorickettsia sennetsu*, *E. Platys*, *E. chaffeensis* (22). En el presente se han descritos solo 5 especies que infecten al hombre

Anaplasma phagocytophilum, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. canis* y *Neorickettsia sennetsu* (15).

Su diagnóstico es reciente en los Estados Unidos, donde es considerada desde 1989 por el Center for Disease Control Control and Prevention (CDC) de Atlanta, USA, como una enfermedad emergente. Las enfermedades infecciosas emergentes se definen como infecciones nuevas aparecidas en una población determinada en los últimos 30 años (10).

La última clasificación fue realizada en base a las similitudes de la secuencia genética del ARN ribosomal 16S entre los genogrupos de *Rickettsia* (*Ehrlichia*, *Cowdria*, *Anaplasma* y *Wolbachia* spp.). El **Grupo I** es renombrado como género *Ehrlichia* integrado por *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ewingii*, y *Cowdria ruminantium*. El **Grupo II** es renombrado como género *Anaplasma*, el cual está integrado por: *E. equi*, *E. phagocytophilum*, Ehrlichiosis granulocítica humana y *E. platys*, la cual infecta plaquetas. El **Grupo III** renombrado género *Neorickettsia* conformado por *N. sennetsu*, *E. risticii*,

agente (SF agent) aislado de la aleta de *S. falcatatus* (un pez parásito) en Japón y *Neorickettsia helminthoeca* (14).

Hasta 1991 se creía que la especie que afectaba al hombre era la *Ehrlichia* monocítica del perro debido a que los pacientes presentaban anticuerpos frente a este agente. A partir del primer aislamiento (cultivo celular DH82 canino) se obtuvo la secuencia completa del gen 16S ribosomal, y se demostró que se trataba de una nueva especie de *Ehrlichia* que también parasitaba a los monocitos, y se denominó *Ehrlichia chaffeensis* (1, 11, 16, 21, 27).

A principios de 1992, se reportaron algunos casos de pacientes provenientes de Minnesota y Wisconsin con síntomas similares a los presentados por aquellos infectados por *E. chaffeensis*, pero la observación de frotis de sangre reveló inclusiones citoplasmáticas exclusivamente en los granulocitos circulantes. Los estudios mediante la técnica reacción en cadena de la polimerasa de las muestras de estos pacientes, revelaron la presencia de *Ehrlichia* spp., estrechamente relacionada a *E. equi*, pero completamente diferente de la especie *E. chaffeensis*. En el año 1993, una tercera especie fue identificada por Chen y col. (11) como causante de Ehrlichiosis; esta especie provoca cuadros más severos, con mayor mortalidad que las anteriores. Esta especie se caracteriza por infectar los granulocitos, preferentemente los neutrófilos y produce la enfermedad conocida como Ehrlichiosis Granulocítica humana (ECG). A esta especie se le denominó *E. phagocytophila*.

En América del Sur, a fines de la década de los 90, Chile y Argentina reportan casos positivos por serología (22). En Venezuela, en 1992, Árraga y col. (4) demuestran el primer caso de Ehrlichiosis humana, en una lactante de 17 meses de edad, en quien se detectaron anticuerpos frente a *E. chaffeensis*. A

partir de entonces se comienzan a procesar, en la Unidad de Investigaciones Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinaria de la Universidad del Zulia, muestras de sangre de pacientes con síntomas sugestivos de Ehrlichiosis, en número mayor a 400 hasta agosto de 1997. En Caracas, Maracaibo, Valencia, área metropolitana de Maracay y otras ciudades importantes, la opinión general de los veterinarios es que existe una estrecha relación entre la frecuencia de Ehrlichiosis en animales (especialmente caballos y perros) y la presencia de esta enfermedad en humanos. Los trabajos realizados parecen indicar un aumento considerable de la presencia de Ehrlichiosis humana en los últimos años (3, 20, 32).

La enfermedad en humanos se presenta como un cuadro agudo que aparece dos semanas después de la picadura de garrapata y se caracteriza por fiebre, mialgia y cefalea. El cuadro febril de la Ehrlichiosis es similar a la producida por la Fiebre Manchada de las montañas Rocosas, con la excepción de que en la Ehrlichiosis se encuentra la mórula y en esta última está ausente y que la serología para *R. rickettsi* resulta negativa. El signo cardinal de la infección es fiebre mayor de 38°C, que se incrementa rápidamente en uno o dos días a 40°C o más, con poca respuesta a los antipiréticos convencionales, acompañada por cefalea de leve a severa intensidad, astenia, fatiga, mialgias, artralgias, escalofríos, sudoración profusa y manifestaciones gastrointestinales como náuseas, vómitos y anorexia.

Los síntomas respiratorios son comunes e incluyen: faringitis, coriza y disnea, debido a neumonía intersticial. Las manifestaciones hemorrágicas se identifican por petequias y equimosis en piel y mucosas. Algunos sangramientos se manifiestan como hemorragia gastrointestinal, epistaxis y coagulación intravascular diseminada (CID). En casos seve-

ros, linfadenopatías, hepatomegalia y esplenomegalia, pueden ser observadas (19).

Con respecto a los métodos diagnósticos se encuentran el examen microscópico directo, realizado mediante identificación de las mórulas en los leucocitos circulantes en frotis de capa blanca. Esto se define como extendidos de sangre donde se concentran plaquetas, leucocitos y la porción superior de la capa roja. Cuando una porción de sangre es centrifugada a 11.000 rpm. Los colorantes utilizados para la observación del microorganismo son: Diff-Quik o Giemsa. Es una técnica sencilla, económica y a la disposición de todos los laboratorios. En aproximadamente el 4% de los casos durante la fase aguda de la enfermedad, se puede demostrar microscópicamente la, mórula intracitoplásmática. Las mórulas también pueden ser demostradas por inmunohistoquímica, en tejidos obtenidos por biopsia y autopsia (3, 4, 23).

Las técnicas serológicas y, en especial, la inmunofluorescencia Indirecta (IFI) son las más empleadas en el mundo para diagnosticar esta enfermedad. Con IFI se demuestran anticuerpos contra el agente causal. Las IgG tardan en aparecer entre 14 y 21 días después de la infección, por lo que en fase aguda, se pueden encontrar títulos por debajo del umbral de positividad. Para confirmar que la sintomatología descrita es debida a una infección por *Ehrlichia* se deben tomar 2 muestras de suero: agudo y convaleciente (15-30 días después de la primera toma). Con IFI se demuestra seroconversión (de negativa pasa a $>1/64$) o incremento de los títulos. En el caso de *E. chaffeensis*, títulos únicos de IgG >128 son positivos. Se ha demostrado, que en muchos pacientes, hay un incremento de IgM e IgG para la segunda semana de la infección. Sin embargo, ya en los primeros 15 días de la infección el paciente tiene un aumento de los títulos IgG. Altos títulos han sido observados

por largo tiempo, como dos años después de la enfermedad aguda (13, 14, 22, 38).

La desventaja de la técnica IFI es que existen reacciones cruzadas entre especies del mismo grupo y en menor grado entre especies de grupos diferentes. Los anticuerpos reactivos a una especie de *Ehrlichia* pueden presentar una reacción cruzada con otras especies de *Ehrlichia*. Ejemplo: *E. canis* con *E. chaffeensis*; *E. equi* con HGE; *E. ewingii* con *E. chaffeensis*; *E. risticii*, con *N. sennetsu* y VHE con *E. chaffeensis*. La reacción cruzada entre diferentes especies, hace el diagnóstico un reto y puede ser ayudado por la información epidemiológica y/o la aplicación de pruebas moleculares (12, 13, 22, 38).

El aislamiento directo mediante el cultivo representa la prueba diagnóstica de elección para el diagnóstico confirmatorio, pero es también la más difícil, tanto por la complejidad del procedimiento como por el tiempo que consume; se necesitan entre 14 a 34 días para obtener resultados positivos, por lo que no es un método conveniente (11).

El diagnóstico molecular que consiste en la amplificación del ADN ehrlichial mediante el ensayo reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el método más sofisticado usado para la detección de la infección. Este ensayo fue aprobado por el CDC y luego fue implementándose en algunos laboratorios de Estados Unidos, así como en un número creciente de laboratorios de investigación y comerciales. En el ensayo de PCR, la sensibilidad y especificidad pueden variar entre ensayos individuales. En personas infectadas con *E. chaffeensis* el ADN ehrlichial ha sido detectado por ensayo PCR de pacientes febriles, no tratados, en un tiempo tan prolongado como 7 semanas desde el inicio la enfermedad. El ensayo PCR modificado conocido como PCR anidada o nested PCR, ha demostrado ser más sensible que la PCR estándar. Los pri-

mer utilizados provienen de la secuencia genética que codifica el ARN ribosomal 16S de *Ehrlichia*, elemento utilizado a su vez para la clasificación del microorganismo (2, 7, 14, 37).

El gen blanco ideal para la amplificación en el ensayo PCR es el ARN ribosómico 16S debido a que exhibe altos niveles de conservación estructural y bajos niveles de secuencias divergentes menores de 0,5%, lo que lo coloca como el método ideal para la clasificación del organismo, sus diferentes especies y la determinación de la relación filogenética de la bacteria (8, 14, 19, 37).

Debido a la localización geográfica del estado Zulia, con amplias áreas boscosas y selváticas, idóneas para la supervivencia de las garrapatas; los estudios serológicos, con resultados positivos en perros, la evidencia de anticuerpos contra especies de *Ehrlichia* en muestras de pacientes con manifestaciones asociadas a la enfermedad, así como la observación de mórulas en sangre periférica en pacientes con sospecha clínica de Ehrlichiosis Humana, se hace necesario confirmar la presencia de infección por *Ehrlichia* spp. en dichos pacientes mediante métodos de diagnósticos serológicos y moleculares y de esta manera se evitará que dichos cuadros clínicos sean diagnosticados como síndromes febriles prolongados de etiología desconocida.

El objetivo general de este trabajo es Investigar la presencia de infección por *Ehrlichia* spp., en pacientes con sospecha clínica de Ehrlichiosis Humana.

Materiales y métodos

Se diseñó un estudio descriptivo, prospectivo y longitudinal que tomó en cuenta las manifestaciones clínicas de los pacientes y la relación de éstas con la infección por la bacte-

ria, a través de la realización de pruebas serológicas y moleculares en muestras de pacientes que fueron recolectadas.

Se estudiaron 30 sujetos de diferentes sexo (17 hombres y 13 mujeres) con edades entre 18 y 67 años; provenientes de las consultas de infectología, reumatología y medicina interna de centros de salud públicos y privados del estado Zulia, que acudieron entre Diciembre del 2004 y Septiembre del 2005. Se utilizaron los siguientes criterios de inclusión: antecedentes de picadura de garrapata, síndrome febril prolongado o fiebre de origen desconocido, tos, faringitis, disnea, petequias y/o equimosis en piel y mucosas; mialgias y artralgias. Se excluyeron todos aquellos pacientes que no presentaron el antecedente de picadura de garrapata y cuadros clínicos distintos al antes mencionado.

Entrevista personal

Se realizó una entrevista personal a los sujetos de la muestra en estudio, para investigar antecedentes de picadura de garrapata, tenencia de mascotas, y/o antecedentes epidemiológicos (visita a regiones rurales), signos y síntomas compatibles con la patología y tiempo de evolución.

Obtención de las muestras

Se tomaron 2 muestras de sangre periférica, cada una, en dos oportunidades separadas por un lapso de 15 días. Bajo campana de flujo laminar, se tomó una muestra de sangre venosa, esta muestra se distribuyó de la siguiente manera: 6 cc fueron colocados en tubo de vidrio vacutainer con EDTA, que fueron usados para el ensayo de PCR. La muestra para serología, consistió de 4cc colocada en tubo sin anticoagulante, se centrifugó a 2.500 rpm por 10 minutos y el suero obtenido fue alicuotado en tubos de ensayo en cantidades de 2 cc y almacenado a 20°C hasta

el momento de ser procesado. Las muestras para el ensayo de PCR fueron transferidas, a viales de 1.5-2 mL de polietileno sin contaminantes. Las muestras fueron almacenadas a -20°C por unas horas y luego congeladas a -60°C , hasta su procesamiento.

Pruebas diagnósticas

Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Para realizar la prueba de inmunofluorescencia Indirecta se utilizaron láminas especiales (Cell-line Associates INC, New Jersey, U.S.A) las cuales están cubiertas con material adherente dejando fosos para depositar la dilución de células humanas infectadas con *E. chaffeensis*, la cual servirá como antígeno para esta prueba. Las células infectadas fueron gentilmente cedidas por la microbióloga Jackeline Dawson del CDC de Atlanta, USA. Las láminas-antígeno, una vez preparadas, fueron fijadas por inmersión en acetona absoluta por 10 minutos a temperatura ambiente y almacenadas en porta-láminas plásticos a -70°C hasta su uso.

La observación de células-antígenos, con cuerpos fluorescentes de color verde manzana brillantes, es indicativo de positividad. Como control positivo se utilizó suero canino seropositivo para *E. canis* y como control negativo se utilizó sueros caninos seronegativos para *E. canis*. No se utilizaron sueros con *E. chaffeensis* debido a la poca disponibilidad, bajos títulos presentes en los sueros de pacientes del país. En base a que se ha demostrado reiteradamente cruce antigénico entre *E. canis* y *E. chaffeensis* se utilizó como control positivo sueros positivos a *E. canis* con título mayor 1/512. El título final fue aquella dilución donde se observó la fluorescencia indicada seguida de una dilución negativa. Se consideró como prueba negativa aquella cuya dilución tuviera tí-

tulos iguales o menores 1/64 y como prueba positiva la seroconversión y títulos mayores de 1/64.

Reacción en cadena de la polimerasa. Se realizó una nested PCR, con 20 ciclos en la primera ronda de amplificación y 50 ciclos en la segunda ronda de amplificación los parámetros de la primera ronda de amplificación fueron: Desnaturalización a 94°C , por 45 segundos e hibridación y elongación a 72°C por 1,5 minutos. En la segunda ronda de amplificación la desnaturalización se realizó a una temperatura de 94°C por 45 segundos, la hibridación a 50°C por 1 minuto y la elongación a 72°C por 1 minuto. Seguidos de una extensión final a 72°C por 5 minutos (6).

Lisis celular y extracción del ADN. Para la extracción del ADN se utilizó el kit comercial TheWizard® Genomic DNA Purification, de la casa Promega. Este kit se basa en 4 pasos: El primer paso consiste en los procedimientos de purificación y lisis celular y nuclear. El aislamiento del ADN de células blancas, incluye lisis de eritrocitos con solución de lisis celular, seguida por lisis de las células blanco y sus núcleos, con solución de lisis nuclear. Las proteínas celulares son removidas por un paso que incluye precipitación, dejándose el ADN de alto peso molecular en la solución. Finalmente el ADN genómico es concentrado y precipitado con isopropanol (31).

Los pasos para la extracción del ADN se muestran a continuación:

1. Se añadió 900 μL de solución de lisis celular estéril a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL (31).
2. Se agitó el tubo de sangre y mezcló completamente, luego se transfirió la sangre a un tubo que contenía solución de lisis celular. Se invirtió el tubo 5-6 veces para mezclar (31).

3. Se incubó la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente y se invirtió 2-3 veces durante la incubación para lisar las células rojas. Se centrifugó a 13.000 a 16.000 g por 20 segundos a temperatura ambiente (31).
 4. Se removió y descartó el sobrenadante, sin desechar los pellets blancos; aproximadamente de 10-20 μL del líquido fueron colocado en tubo de 1,5 mL de capacidad (31).
 5. Se agitó vigorosamente hasta que los leucocitos fueron resuspendidos (10-15 segundos) (31).
 6. Se añadió 300 μL de solución de lisis nuclear al tubo que contiene las células resuspendidas. La pipeta con la solución se invirtió de 5-6 veces para la lisis de los leucocitos. La solución se tornó viscosa. El grupo de células es visible después de la mezcla y se incubó la solución a 37°C hasta que el grupo se disgregó (31).
 7. Se añadió 1,5 μL de solución ARNasa para el lisado nuclear y se mezcló la muestra por inversión de 2 a 5 veces en tubo. Se incubó la mezcla a 37°C por 15 minutos y luego se enfrió a temperatura ambiente (31).
 8. Se añadió 100 μL solución de lisado nuclear para a precipitación y se colocó en el vortex por 10-20 segundo (31).
 9. Se centrifugó a 13.000-16.000 por 3 minutos a temperatura ambiente la muestra (31).
 10. Se transfirió el sobrenadante para un tubo de microcentrifuga limpio con una capacidad de 1,5 cc. Conteniendo 300 μL de isopropanol a temperatura ambiente (31).
 11. Se mezcló suavemente la solución por inversión hasta que la hebra filiforme blanca de ADN fuera visible (31).
 12. Se centrifugó una muestra de 300 μL a 13.000-16.000 g por 1 minuto a temperatura ambiente el ADN fue visible como pequeños pellets blancos (31).
 13. Se añadió etanol al 70% al ADN y se descartó el sobrenadante. Suavemente se invirtió el tubo para lavar el pellet de ADN y las caras del tubo de la microcentrifuga y se centrifugó como el paso 12 (31).
 14. Se aspiró cuidadosamente el etanol usando una pipeta con contador de goteo. Las partículas de ADN son muy sueltas en este punto y se debe tener cuidado para evitar aspirar partículas de ADN en la pipeta. Se invirtió el tubo sobre una servilleta de papel absorbente y se dejó secar al aire las partículas por 10-15 minutos (31).
 15. Se añadió 100 μL de solución de rehidratación al tubo y se incubó a 65°C por 1 hora. Periódicamente se mezcló suavemente la solución. Alternamente se rehidrató el ADN y se incubó en una solución por toda la noche a temperatura ambiente (31).
 16. Se almacenó el ADN entre 2-8°C (31).
- Procedimiento de nested PCR.** La mezcla de reacción de 50 μL contiene: 50 mmol/KCL Tris-HCL, pH 8,3; 2 mmol MgCl_2 ; 200 mmol/L de cada nucleótido trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), y 2,5 U de Taq ADN polimerasa. Se añadió 1 μL del ADN extraído y 0,05 picomoles de cada primer y se procedió a realizar el ensayo PCR de 20 ciclos con los parámetros antes señalados. Los primers externos son **EHR-OUT1:** 5'CTGGCG GCAAGCYTAACACATGCCAACAT3' y **EHR-OUT2:** 5'GCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGAC3' (6).
- Luego, un volumen de 5 μL del producto de amplificación del ensayo PCR se usó para la amplificación con los primers internos:

- **GE2F:** 5´GTTAGTGGCATAACGGGTGAAT3´
- **EHRL3IP2:**5´TCATCTAATAGCGATAAATC3´

Se realizaron 50 ciclos bajo las condiciones ya descritas (6).

Los primers externos e internos utilizados en la reacción son derivados de la secuencia genética que codifica el ARN ribosomal de *Ehrlichia* spp. Por lo tanto proporcionan información de género más no de especie, teniendo en cuenta que se necesitan primers de género que pudieran detectar Ehrlichias de cualquier huésped (6, 13).

El tamaño del producto amplificado fue de 156 bp con los primers específicos para género de Ehrlichia. El laboratorio encargado de la síntesis de los primers fue BioSource international Inc. (6).

Los productos de la segunda PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%, el cual se preparó con 1 g de agarosa, buffer tris-borato (TBE); que a su vez se preparó con 54 g de tri-base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de ácido-etilen-diamono-tetraacético (EDTA) a un pH 8,33, con tinción de bromuro de etidio (6).

El tiempo de la corrida fue aproximadamente de 60 min, a 140 voltios, observándose las bandas de ADN a través de un transiluminador de luz ultravioleta "Geldoc" (Equipo de documentación de geles AlphaInnotech Corporation) (6).

La comparación de las secuencias de los genes que codifican para el ARN ribosomal es reconocido como uno de las más poderosos y precisos métodos para determinar la relación filogenética de las bacterias (31).

Se procesó además un control positivo (ADN genómico de la cepa *Ehrlichia chaffeensis* VR-1454 (ATC). Nombre de la cepa: St. Vincent, proveniente de pacientes con HIV y Hepatitis B que desarrollaron

Ehrlichiosis Humana fatal (30). El nivel de bioseguridad de la cepa es 2 y las células donde se realiza su cultivo son las DH82 macrófagos caninos ATTC CRL-10389 o las células de pulmón embrionarias humanas. El control negativo utilizado fue ADN extraído de linfocitos humanos proveniente de muestras sanguíneas del Banco de sangre de Maracaibo, previamente examinadas y negativas para HIV, Hepatitis B y VDRL.

Los resultados se expresaron como negativos si no se detectó ADN de *Ehrlichia* spp. y positivos en caso contrario (6).

Método de análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron en valores absolutos y porcentaje. Se utilizaron cuadros de distribución de frecuencia y porcentajes.

Resultados

En el grupo de 30 sujetos con manifestaciones clínicas sugestivas de Ehrlichiosis Humana las 60 muestras recolectadas en los días 0 y 15 de la enfermedad no reportaron seroconversión, con títulos iguales o menores a 1/64; lo que se interpreta como prueba negativa sin evidencia de anticuerpos contra el antígeno utilizado en la prueba (células humanas infectadas con *E. chaffeensis*. Como prueba confirmatoria se realizó el ensayo nested-PCR a las 20 muestras de sangre periférica, utilizando primers derivados de las secuencias genéticas del 16S rRNA de *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. equi* y *E. ewingii* que permiten hacer identificación a nivel de género obteniéndose también resultados negativos.

En la Tabla 1 se muestran los motivos de consulta que presentaron los 30 pacientes picados con garrapata, clínicamente sugestivos de Ehrlichiosis Humana.

De los 30 sujetos estudiados, 7 (23%) afirmaron haber visitado zonas rurales boscosas en las últimas 3 semanas, (42,85%) estuvieron en un lugar rural 20 días previos a la toma de la primera muestra, 2 (28,57%) estuvieron 15 días antes de la toma y 2 (28,57%) afirmaron haber realizado dicha visita en los 30 días previos a la recolección de muestras, en más de una oportunidad habían sido picados por garrapatas en el campo. El resto (23 sujetos) habían sido picados por garrapatas de perro en aéreas urbanas.

Treinta pacientes (100%) afirmaron la tenencia y contacto con caninos, algunos por un tiempo prolongado (20 años) y otros por menor tiempo (Tabla 2).

Ocho (27%) de los pacientes aseveraron el inicio de síntomas 15 días antes del interrogatorio; 4 (13%). Veintiún días antes; 6 (20%), un mes antes; 7 (23%), dos meses antes y 5 (17%) más de tres meses antes.

Discusión

La Ehrlichiosis Humana, específicamente la Ehrlichiosis Monocítica Aguda producida por *E. chaffeensis* es una enfermedad cuyo diagnóstico es difícil debido al espectro variable de las manifestaciones clínicas. En muchos casos, la Ehrlichiosis humana es asociada con hallazgos inespecíficos y pocas veces es lo suficientemente severa como para provocar la muerte. La patogenicidad en humanos no es aún del todo conocida, según los resultados de varios estudios llevados a cabo, la severidad de la enfermedad está relacionada con factores inherentes al huésped como la inmunosupresión, edad avanzada, la virulencia de la bacteria, el retardo en el diagnóstico y el inicio de la terapia (5, 11, 13, 14, 16, 27). La relación entre Ehrlichiosis e inmunosupresión quedó confirmada en el estudio de Tamí y col. (34) donde detectaron presencia

Tabla 1. Motivos de consulta de pacientes con manifestaciones clínicas sugestivas de Ehrlichiosis Humana.

Motivo de Consulta	Nº	%
Fiebre	12	40
Artralgias	6	20
Mialgias	4	13
Faringitis Severa	5	17
Petequias	3	10
Total	30	100

Tabla 2. Antecedentes de tenencia de mascotas (caninos) entre pacientes con clínica sugestiva de Ehrlichiosis Humana.

Lapso de Tiempo (años)	Nº	%
20	10	33,33
15	7	23,33
12	3	10,00
5	5	16,66
3	2	6,66
1	3	10,00
Total	30	100,00

de mórulas en plaquetas en 13 de 87 (13,8%) pacientes con infección por VIH/SIDA y es uno de los pocos trabajos donde se demuestra la infección de plaquetas por este microorganismo, lo que podría explicar la trombocitopenia presente en estos pacientes, Dumler y col. (15).

Venezuela es un país tropical con alta población de garrapatas. Las enfermedades febriles de etiología desconocida son comunes en este país. Ambos son importantes factores en relación con el hallazgo de una infección humana por Ehrlichia. Pérez y col. (29), realizaron en el año 1996 el primer aislamiento y caracterización serológica y genéti-

ca de una *Ehrlichia* spp. de un humano en Suramérica (Venezuela) al cual denominaron VHE (Ehrlichiosis Humana Venezolana) íntimamente relacionada con *E. canis*.

En la ciudad de Maracaibo, Alvarado y col. (4), realizaron el reporte del primer caso local de Ehrlichiosis humana causada por *E. chaffeensis*, diagnosticado por serología en el año 1996 y más recientemente en Caracas (Venezuela), Suárez y colaboradores realizaron en el año 2004 el primer reporte de *Ehrlichia chaffeensis* diagnosticado por PCR teniendo el perro como reservorio y la garrapata, *Rhipicephalus sanguineus* como vector (4, 5).

Los 30 pacientes refirieron contacto estrecho con caninos por largo tiempo. En nuestro estudio se relacionó la enfermedad con el perro, debido a que los casos que se han demostrado en Venezuela infecciones humanas causadas por *E. canis* (30). Según varios autores los perros (*Canis familiaris* o *C. lupus*) son potencialmente el más importante reservorio para cualquier patógeno zoonótico por la posibilidad de contacto que ofrece al vector debido a su número, su estilo de vida libre y su proximidad con los humanos.

Según Breitschwerdt y col. (6), los perros domésticos sirven como huéspedes o reservorios de todos los estadios del ciclo de vida de *Amblyoma americanum* y proveen un vehículo para el transporte de garrapatas dentro del ambiente peridoméstico. A su vez el perro es reservorio y susceptible de enfermarse con *E. chaffeensis* y patógenos íntimamente relacionados incluyendo *E. canis*, *E. ewingii* y *Anaplasma platys*. Los estudios sugieren que perros infectados por *E. chaffeensis* permanecen infectados o pueden ser reinfectados con este organismo después de haber sido curados con antibioticoterapia (6).

La picadura de garrapata fue un antecedente común en todos los encuestados, este es un hallazgo documentado hasta en el 97% de los casos de ehrlichiosis humana según Olano y col. (25). Fichtenbaum y col. (16), afirman que la exposición a garrapatas es un factor común entre los pacientes con Ehrlichiosis Humana en los Estados Unidos de América. Los resultados de Fishbein y col. (17), soportan que todos los estadios de la *A. americanum*, principal especie implicada en la transmisión de *E. chaffeensis*, son capaces de transmitir dicha bacteria. Recientemente Unver y col. (35), demostraron a través de cultivo, aislamiento y caracterización antigénica la presencia VHE en perros, garrapatas (*R. sanguineus*) y un humano en Venezuela, sugiriendo que los perros pueden actuar como reservorio de la infección por VHE y que *R. sanguineus*, ocasionalmente muerde a humanos, puede actuar como vector.

Estos mismos autores afirmaron según la secuencia 16S rRNA probada, que VHE y *E. canis* son el mismo organismo parasitando huéspedes de distinta especie. Los autores sustentan la idea de que los humanos están en riesgo de adquirir las *Ehrlichia* spp. de animales infectados cuando el vector pica simultáneamente animales y humanos. También en el estado Zulia la especie que infecta al perro es *R. sanguineus*, principal responsable de la transmisión de *E. canis* en perros en Norteamérica, Suramérica y con casos reportados de infección en humanos en la región del Mediterráneo y América Central (9, 14, 16, 32).

En Venezuela, Suárez y col. (33), señalan la garrapata *Amblyoma cajennense* como probable vector de *E. chaffeensis* a humanos. Lo anterior resulta interesante, ya que de acuerdo a la literatura especializada, la especie de garrapata presente en nuestro estado es la garrapata parda del perro (*Rhiphi-*

cephalus sanguineus), la cual no es considerada hasta la fecha como vector de *Ehrlichia chaffeensis*, sólo se le considera como vector de *E. canis* para el ser humano.

En el caso de las manifestaciones clínicas los 30 pacientes tenían más de quince días de inicio de la sintomatología antes de la entrevista y toma de la primera muestra para serología. Estos resultados coincidieron con los hallazgos de Fishbein y col. (17), quienes establecen la presentación de la clínica dos semanas después de estar expuestos a las garrapatas. En este estudio no se pudo constatar el tiempo comprendido entre la aparición de la clínica y la exposición a la garrapata debido a que ninguno de los encuestados ofreció datos sobre el número de veces que pudo estar expuesto a la picadura, ya que la mayoría, viven y manipulan caninos.

Nuestros pacientes el 100% manifestaron contacto con cánidos, algunos por más de 20 años, el 40% acudió a la consulta por fiebre, el 23% tenían antecedentes epidemiológicos, presentaron fiebre en el 64%, manifestaciones hemorrágicas en el 10%, faringitis en un 47% de los casos y manifestaciones musculoesqueléticas en un 40% de los casos, las cuales son manifestaciones clínicas citadas en casos de ehrlichiosis.

Con respecto a las manifestaciones vasculares reportadas en nuestro estudio el 10% de los sujetos, presentó petequias en miembros inferiores, tronco y dorso. Varios autores (9, 16, 24) explican que el rash asociado a la HME es variable en carácter, distribución y tiempo de ocurrencia y puede manifestarse, en 10 al 40% de los pacientes, como petequias, máculas o pápulas; ocurre una vez comenzada la enfermedad (promedio 5 días) después del inicio de los síntomas; puede ser pasajera o permanente; afecta tronco, cara o extremidades y rara vez las palmas de las manos o la planta de los pies. De acuerdo a lo an-

terior, la muestra escogida podría corresponderse con casos de Ehrlichiosis monocítica.

En el presente estudio las 30 muestras para serología arrojaron resultados negativos. Los resultados del ensayo serológico pudieran ser falsos negativos, por ello, para descartar esta posibilidad se tomaron muestras en dos oportunidades (días 0 y 15) como bien lo documentan en su estudio Paddock y col. (28), donde explican que resultados serológicos negativos para la fase aguda no necesariamente excluyen el diagnóstico. Las pruebas serológicas disponibles pueden resultar negativas para la mayoría de los pacientes durante la primera semana de la enfermedad. No fue el caso en este estudio ya que en ambas muestras los resultados fueron negativos.

En otro estudio de Paddock y col. (26), sostienen que aunque los títulos de IgG e IgM pueden ser medidos por IFI, la IgG es negativa en el 80% de los pacientes en la primera semana de la enfermedad y la IgM puede también no aportar ninguna información en este momento, entonces se debe obtener una muestra de suero en fase aguda y otra en fase de convalecencia (2 semanas después), donde más del 80% de los pacientes han desarrollado títulos por 6 semanas posterior a la infección. A su vez los autores expresan que la ausencia de seroconversión no es regla para dejar por fuera el diagnóstico de Ehrlichiosis debido a que una pequeña fracción de pacientes no desarrollan anticuerpos detectables una vez infectados por *E. chaffeensis*, en algunos casos esta falla de la seroconversión puede ser atribuida a un deterioro inmune, debido a la rápida y agresiva progresión del cuadro clínico, pero en otras instancias la razón no ha sido aún aclarada (23, 25, 27).

Vinasco y col. (36) fue el primero en detectar ADN de *Ehrlichia canis* en 25 mues-

tras de sangre provenientes de perros de la ciudad de Lima, Perú, aplicando la técnica de PCR y usando los mismos primers que nosotros. En nuestro estudio se realizó una nested-PCR, los primers externos e internos utilizados en la reacción son derivados de la secuencia genética que codifica el ARN ribosomal 16S de *Ehrlichia* spp. (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. equi* y *E. ewingii*), por lo tanto proporcionan información de género, más no de especie (6, 8, 37).

El Consenso para el abordaje de la Ehrlichiosis Humana del CDC (Task Force on consensus Approach for Ehrlichiosis) (TFCAE) exige a los laboratorios establecer y validar un ensayo molecular para el diagnóstico de Ehrlichiosis Humana (18). La recolección sistemática de muestras de sangre en pacientes sugestivos, como los nuestros, son necesarios para aprobar un diagnóstico. La obtención de resultados negativos en la prueba PCR, podría deberse a que estamos en presencia de una especie diferente de *Ehrlichia* en nuestro país, como lo sucedido en el estudio chileno de López y col., o que se trate de una enfermedad originada por otra bacteria o virus (22).

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio no demuestran evidencia de infección por *Ehrlichia chaffeensis* en los pacientes con síntomas y signos similares a los de la Ehrlichiosis Humana, ya que a través de pruebas serológicas no se evidenciaron anticuerpos contra *Ehrlichia chaffeensis* y en las pruebas moleculares no hubo amplificación de la secuencia genética.

Los datos obtenidos permiten descartar la enfermedad por este agente, pero no por otro, descubierto por Arraga y colaboradores en el estado Zulia, aún no clasificado por el

CDC. En especial si se consideran los 12 casos diagnosticados por serología desde 1994, en el Laboratorio de Investigaciones Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad del Zulia y los numerosos casos (más de 400 entre 1994-1999) causados por un nuevo agente, que si bien los estudios de microscopia electrónica revelaron que no era una especie de *Ehrlichia*, si cumplía con las características de una *Rickettsia*, por ello la MSc. Cruz Árraga, quien conduce estos estudios, decidió nombrarlo *Rickettsia Plaquetaria Humana*, en espera aún de estudios de aislamientos e identificación.

A la luz de la información obtenida en este trabajo se hace necesario realizar estudios multidisciplinarios que involucren a especialistas en diagnóstico molecular, infectólogos, epidemiólogos, médicos generales y médicos veterinarios, entre otros, con el objeto de precisar la real magnitud e importancia de estos agentes en nuestro país, por agentes infecciosos que son considerados como emergentes a nivel mundial.

Referencias bibliográficas

- [1] Anderson B, Dawson J, Jones D, Wilson K. 1991. "*Ehrlichia chaffeensis*. A New Species Associated With Human Ehrlichiosis". Division of Viral and Rickettsial Diseases. Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia. J Clin Microbiol. 29 (12): 2838-42.
- [2] Anderson B, Summer J, Dawson J, Tzianabos J, Greene J, Olson J, Fishbein D, Olsen Rasmussen M, Holleway B, George E. 1992. "Detection of the Etiologic Agent of Human Ehrlichiosis by Polymerase Chain Reaction". Journal of Clinical Microbiology. 30 (4): 775-780.
- [3] Arraga C. 1994. "Ehrlichiosis Humana. Revisión". Investigaciones Clínicas. 35 (4): 209-222.
- [4] Arraga C, Ojeda M; Bernardoni A; Anderson B. 1996. "Ehrlichiosis Humana. Reporte del

- primer caso en Venezuela". Investigaciones Clínicas. 37 (1): 35-49.
- [5] Arraga C. 2000. Ehrlichiosis y Rickettsias plaquetarias en humanos. VII Congreso Venezolano de Microbiología. Maracaibo. Venezuela.
- [6] Breitschwerdt E, Hegarty B, Hancock S. 1998. "Sequential Evaluation of Dogs Naturally Infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella vinsonii*". Journal of Clinical Microbiology. 36 (9): 2645-265.
- [7] Brown G, Martin A, Roberts T, Aitken R. 2001. Detection of Ehrlichia platys in dog in Australia. 79: 554-558. University New Castle, University Drive, Callaghan. Disponible on-line: www.ivis.org
- [8] Comer J, James A, Nicholson W, Sumner J, Olson J, Childs J. 1999. "Diagnosis of Human Ehrlichiosis by PCR Assay of Scute-Phase Serum" Journal of Clinical Microbiology. 37(1): 31-34.
- [9] Centers for Disease Control and Prevention. 1996. "Human Ehrlichiosis Maryland, 1994". Morb. Mortal. Wkly. Rep. 45: 798-802.
- [10] Center for Disease Control. Division of Viral and Rickettsial Human Ehrlichiosis in the United States. 2000. Disponibles on-line: CDC.org.com
- [11] Chen S M, Dumler J S, Bakken J S and Walker D H. Identification of a Granulocytotropic Ehrlichia Species as the Etiologic Agent of Human Disease, 1994. Journal Of Clinical Microbiology, Mar. 1994, Vol. 32, No. 3 p. 589-595.
- [12] Dawson J, Anderson B, Fishbein D, Sanchez J, Goldsmith C, Wilson K, Duntley W. 1991. "Isolation and Characterization of an *Ehrlichia* sp. From a patient diagnosed with human Ehrlichiosis". J. Clin Microbiol. 29: 2741-2745.
- [13] Dawson J, Ewing S. 1994, "Susceptibility of Dogs to Infection with *Ehrlichia chaffeensis*, causative agent of Human Ehrlichiosis". Am. J. Vet. Res. 53:1322-1327.
- [14] Dumler J, Barbet A, Bekker C, Dasch G, Palmer G, Ray S, Rikihisa Y, 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 species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*". Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51(6): 2145-65.
- [15] Dumler S, Madigan J, Pusterla N, Bekken J. 2007. Ehrlichioses in Human: Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis and Treatment. Clinical Infection diseases: S45-51.
- [16] Fichtenbaum C, Peterson L, Weil G. 1993. "Ehrlichiosis presenting as a life-threatening illness with features of the toxic shock syndrome" Am. J. Med. 95:351-357.
- [17] Fishbein D, Dawson J, Robinson L. 1994. "Human Ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990". Ann. Intern. Med. 120:736-743.
- [18] Glynn K, Krammer V, Vugia D. 1996. "Human Ehrlichiosis: New Emerging Tick-Borne Diseases in California". Division of Communicable Disease Control California Morbidity. Disponible on-line: www.ivis.org
- [19] Goldman D, Artenstein A, Bolan C. 2001. "Human Ehrlichiosis: A Newly Recognized Tick-Borne Disease". American Family Physician. Disponible on-line: www.findarticles.org
- [20] Harrus S, Waner T. 2000. Ehrlichiosis Monocítica Canina: Recent Advances in canine infectious Disease. Israel Institute for Biological Research, Ness-Ziona, Israel Veterinary Teaching Hospital, School of Veterinary Medicine, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel. Disponible on-line: www.ivis.org
- [21] Heo E, Park J, Park M Y, Dumler J, Chae J. 2002. "Serologic and Molecular Detection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophila* (Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent) in Korean Patients". Journal of Clinical Microbiology. 40(8):3082-3085.
- [22] López J, Rivera S, Concha J, Gatica S, Loeffholz M, Barriga O. 2003. "Ehrlichiosis

- Humana en Chile, Evidencia Serológica". *Revista Médica Chilena*. 13(1):67-70.
- [23] Maeda, K, Markowith N, Hawley R, Ristic M, Cox D, McDade J, 1987. Human infection with *Ehrlichia canis* a leukocytic *Rickettsia*. *New England Journal Med*. 316(14): 853-856.
- [24] Olano P, Masters E, Cullman L, Hogrefe W, Yu X, Walker D. 1999. "Human monocytotropic Ehrlichiosis (HME): epidemiological, clinical and laboratory diagnosis of a newly emergent infection in the United States". In D. Raoult and P. Brouqui (ed), *Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millennium*. Elsevier, Paris, France. P. 262-268.
- [25] Olano J, Hogrefe W, Seaton B, Walker D. 2003. "Clinical Manifestations, Epidemiology, and Laboratory Diagnosis of Human Monocytotropic Ehrlichiosis in a Commercial Laboratory Setting". *Journal of Clinical Microbiology*. 10(5): 891-896.
- [26] Paddock C, Sumner W, Shore G, Bartley D, Elie R, McQuade J, Martin C, Goldsmith C, Childs J. 1997. Isolation and characterization of *Ehrlichia chaffeensis* strains from patients with fatal Ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol*. 35:2496-2502.
- [27] Paddock C, Folk S, Shore G, Machado L, Huycke M, Slater L, Liddell A, Buller R, Storch G, Monson T, Rimland D, Summer J, Singlenton J, Bloch K; Tang Standaert S, Childs J. 2001. "Infections with *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in persons coinfecting with human immunodeficiency virus". *Clin. Infect. Dis*. 33:1586-1594.
- [28] Paddock C, Childs E. 2003 "Ehrlichia chaffeensis: a Prototypical Emerging Pathogen". *Journal of Clinical Microbiology*. 15 (1): 37-64.
- [29] Pérez C, 1999. "Ehrlichiosis y Rickettsiosis Plaquetaria". *Enfermedades Humanas poco conocidas en Venezuela*. Boletín de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 19(2): 65-71.
- [30] Pérez M, Rikihisa Y, Wwn B. 1996. "Ehrlichia-Like Agent Isolated from a Man in Venezuela: Antigenic and Genetic characterization". *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9): 2133-2139.
- [31] Promega Corporation. 1999. Wizard genomic DNA purification kit. Technical manual. Part# TM050.
- [32] Rivera R. 2002. "Enfermedades Emergentes y Reemergentes: Un Reto Al Siglo XXI". *Revista Cubana Pediatría*. Disponible on-line: www.findaaricles.org.
- [33] Suárez J., Gutierrez N., Naranjo L., Drummond T., Alvarez M., Torres J., Castro., Martínez N., Triana F., Ruíz J., Watts A. 2004. "Diagnóstico de *Ehrlichia chaffeensis* por Reacción en Cadena de la Polimerasas en humanos. Reporte del primer caso en Venezuela". *Boletín venezolano de infectología*. Vol. 15#2, julio-Diciembre 2004. (66)p
- [34] Tamí I del C; Tamí-Maury I M. Identificación morfológica de *Ehrlichia* sp. en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana, en Venezuela. 2004. *Rev Panam Salud Publica* vol.16 no.5 Washington Nov. 2004.
- [35] Unver A, Pérez M, Orellana N, Huang H, Rikisa Y. 2001. "Molecular and Antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from Dogs, Ticks, and Human in Venezuela". *Journal of Clinical Microbiology*. 39(8): 2788-2793.
- [36] Vinasco J, Li O, Alvarado A, Díaz D, Hoyos L, Tabachi L, Sirigireddy K, Ferguson C and. Moro M H. Molecular Evidence of a New Strain of *Ehrlichia canis* from South America. 2007. *Journal of Clinical Microbiology*. August 2007, vol. 45 no. 8, 2716-2719.
- [37] Wen B, Jian R, Zhang Y, Chen R. 2002. "Simultaneous Detection of *Anaplasma marginale* and a New *Ehrlichia* Species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* by Sequence Analyses of 16S Ribosomal DNA in Boophilus microplus Ticks from Tibet China *Journal of clinical microbiology* 40(8):2015-2020.
- [38] Zhi N, Rikihisa Y, Kim H, Wormser G, Horowitz H H. 1997. Comparison of major antigenic proteins of six strains of the Human Granulocytic Ehrlichiosis agent by Western Immunoblot analysis. *Journal Clinical of Microbiology*. 35(10):2606-2011.