

ARTICULO

Identificación microscópica y molecular de ehrlichias en perros del estado Aragua-Venezuela

Clara Nancy Gutiérrez Gil^{1,2}, María del Carmen Martínez Aguilera^{1,3} y Francisco Javier Triana-Alonso¹

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED-UC). Final calle Cecilio Acosta, Urbanización Cantarrana, Sector Las Delicias, Maracay, estado Aragua, Venezuela.

² Departamento de Microbiología.

³ Departamento de Parasitología. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Sede Aragua. Final Avenida Ruiz Pineda, La Morita II, Maracay, estado Aragua, Venezuela

Correspondencia: C.N.Gutiérrez Gil

E-mail: claranancy88@hotmail.com

RESUMEN

Las bacterias del género *Ehrlichia* son microorganismos intracelulares obligatorios que infectan a mamíferos, entre ellos el perro y el humano. En Venezuela el método de uso rutinario para el diagnóstico de estas bacterias es el Frotis de Capa Blanca (FCB) teñido con coloraciones tipo Romanowski. Este método no permite la identificación precisa de las diferentes especies infecciosas. En este estudio, se identificaron por Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) las especies ehrlichiales correspondientes a inclusiones basófilas intracitoplasmáticas (IBI) o mórulas, observadas por FCB en monocitos o linfocitos de perros. Se realizó hematología completa y RCP a muestras sanguíneas de doce perros, en las que se observaban IBI en monocitos o linfocitos por FCB. Todos los perros presentaron anemia y trombocitopenia. En todos los FCB se observaron IBI en células mononucleares, características de *Ehrlichia canis* o *Ehrlichia chaffeensis*. Cuando se realizó la RCP usando cebadores específicos para especie, en todas las muestras se identificó *Ehrlichia canis* y en cuatro (33,3%) se detectó coinfección con *Ehrlichia chaffeensis*. Este es el primer estudio en Venezuela y Sur América en el que se reporta un número significativo de perros infectados con *E. chaffeensis*, agente etiológico de la ehrlichiosis monocítica humana, por lo que debería estudiarse la importancia del perro como potencial reservorio.

Palabras clave: Ehrlichia, Ehrlichiosis, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, perro, RCP.

ABSTRACT**Microscopic and molecular identification of Ehrlicheae in dogs from Aragua-State Venezuela**

Bacteria of the genus *Ehrlichia* are obligatory intracellular microorganisms able to infect mammals, like dogs or humans. The current diagnosis method for these bacteria in Venezuela is the Buffy Coat Smear

(BCS) with Romanowsky-type staining. However, this methodology does not allow a precise identification of the infective agents. In this study, the ehrlichial species corresponding to the observed basophilic-intracytoplasmic inclusions (BII), or morulae, in monocytes and lymphocytes of 12 dogs, were identified using the Polymerase Chain Reaction (PCR). All dogs presented anemia and thrombocytopenia. BII characteristic of *Ehrlichia canis* or *Ehrlichia chaffeensis* were observed in mononuclear cells in every BCS. The PCR results using species-specific primers demonstrated the presence of *Ehrlichia canis* in all samples and *Ehrlichia chaffeensis* in four (33.3%). This is the first report of a significant number of dogs infected with *E. chaffeensis*, the ethiological agent of human monocytic ehrlichiosis, in Venezuela and South America. The importance of dogs as potential reservoirs for *E. chaffeensis* should be investigated.

Key words: Ehrlichia, Ehrlichiosis, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, dog, PCR.

INTRODUCCIÓN

Ehrlichia canis y *Ehrlichia chaffeensis* son bacterias gramnegativas pertenecientes a la familia *Anaplasmataceae*, responsables de la ehrlichiosis monocítica canina y ehrlichiosis monocítica humana respectivamente; sin embargo, ambas bacterias han sido reportadas tanto en perros como en humanos y son transmitidas por garrapatas (1-8). Infechan principalmente células sanguíneas, en particular células mononucleares y se multiplican dentro de vacuolas intracitoplasmáticas hasta formar las inclusiones basófilas características llamadas mórulas (9).

Para el diagnóstico tanto en animales como en humanos, se ha reportado el FCB teñido con coloraciones tipo Romanowski. Método económico, de fácil ejecución y adecuado para la fase aguda de la enfermedad, pero requiere de un personal con experiencia (9, 10). En varios países, se está utilizando desde 1992, la RCP como método que permite la identificación de especie. Procedimiento de fácil ejecución, útil por su elevada especificidad y sensibilidad (11). Los resultados de la RCP son útiles para confirmar la infección activa pero es una técnica de uso poco común y de escasa disponibilidad entre los médicos humanos y veterinarios (12).

En Venezuela, los pocos laboratorios que realizan diagnóstico de ehrlichiosis, en animales y humanos, generalmente utilizan el FCB, de manera que el diagnóstico se hace sobre la base de las características morfológicas en los extendidos sanguíneos y las manifestaciones clínicas. El propósito de esta investigación fue identificar microscópicamente ehrlichias monocíticas en FCB, así como también diferenciar por RCP las especies monocíticas *E. canis* y *E. chaffeensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Perros. Se seleccionaron doce perros, atendidos en la consulta del Hospital de Pequeños Animales "Dr. Daniel Cabello" (Universidad Central de Venezuela-Núcleo Maracay, Estado Aragua) con signos clínicos de ehrlichiosis canina en cuyos FCB se observaron especies con tropismo por linfocitos y/o monocitos (*E. canis* y/o *E. chaffeensis*). Se les extrajo asépticamente 4 mL de sangre con EDTA, 2 mL se utilizaron para realizar hematología (contador hematológico Coulter Electronic INC Hialeah Florida, Estados Unidos) y el resto se almacenó a -80 °C para posteriormente extraer el ADN y realizar la RCP.

Frotis de Capa Blanca (FCB). Se llenaron con sangre dos tubos capilares por perro y se centrifugaron en una microcentrífuga (Clay Adams, Houston, TX, Estados Unidos) durante cinco minutos. Se realizaron extendidos de la capa blanca, se fijaron con metanol (13) y se tiñeron con coloración de Giemsa modificada (Hemacolor de Merck, Darmstadt, Alemania). Se examinó toda la lámina con microscopio de luz (objetivo de inmersión 100X) a fin de evidenciar la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas.

Extracción de ADN. Se realizó de acuerdo a técnica descrita previamente (14). Se transfirieron 250 μ L de sangre a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Se adicionaron 80 μ L de dodecil sulfato de sodio al 6 %, y 25 μ L de solución de proteinasa K (1 mg/mL, Promega, Madison, WI, Estados Unidos). Después de mezclar suavemente por inversión, las muestras se incubaron a 50°C durante 1 hora. Para la extracción se utilizó fenol equilibrado en Tris-HCl 100 mmol/L, pH 8, seguido de una segunda extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se precipitó el ADN de la fase acuosa con etanol y se resuspendió en 50 μ L de buffer Tris-EDTA (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8).

Reacción en cadena de la Polimerasa (RCP) anidada. Se realizó de acuerdo a lo reportado previamente (14). Para la PCR de género se utilizó 1,75 μ g \pm 0,84 (contenidos en 10 μ l) de las muestras de ADN. Cada muestra fue amplificada en un volumen de reacción de 50 μ L, el cual contenía 5 mmol/L MgCl₂, 0,2 mmol/L de una mezcla de dexoxinucleósidos trifosfato, 1,25 U de *Taq* polimerasa (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) y 2 pmol de los cebadores: ECB (5'-CGTATTACC-GCGGCTGCTGGCA-3') y ECC (5'-AGAACGAACGCTGGCGCCAAGC-3') (4).

Estos cebadores amplifican el ADN de todas las especies de *Ehrlichia* spp y otras especies bacterianas (*Rickettsia*, *Anaplasma*, *Escherichia coli*, entre otras). Al inicio 94°C durante 4 minutos y luego 40 ciclos de 94°C durante 1 minuto para la desnaturalización, 68 °C por 1 minuto para la hibridación, y 72 °C por 1 minuto para la extensión en un termociclador (PTC-200 MJ Research, GMI Inc., Ramsey, MN, USA). Para la RCP anidada la mezcla de reacción y condiciones fueron las mismas como las de la primera RCP, excepto por los cebadores, temperatura de hibridación y el ADN. Para la amplificación de *E. canis* se utilizaron 2 pmol de los cebadores: "canis" (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3') y HE3 (5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3') (4,11). Para la amplificación de *E. chaffeensis* se utilizaron 2 pmol de los cebadores: HE1 (5'-CAATTGCTTATAACC-TTTTGGTTATAAAT-3') (11) y HE3. La temperatura de hibridación fue de 60°C por 1 minuto y 1 μ L del producto de la primera amplificación se utilizó como molde de ADN. Muestras de ADN control positivo fueron purificadas de células DH82 infectadas con *E. canis* o *E. chaffeensis*. ADN purificado de cultivo *Escherichia coli* se utilizó como control positivo para los cebadores ECB y ECC y control de especificidad para el par de cebadores "canis"/HE3 y HE1/HE3. Como control negativo se utilizó ADN purificado de muestras sanguíneas obtenidas de 4 perros recién nacidos sin contacto con garrapatas. Los productos de las reacciones de amplificación se separaron en geles de agarosa al 1,2 %, se colorearon con bromuro de etidio y se fotografiaron con iluminación UV.

RESULTADOS

Hematología y FCB. La edad de los perros estuvo comprendida entre los 2 y 7 años. Entre las características clínicas más importantes se pueden señalar: fiebre (entre 40°C y 41°C, valores normales: 37,5-39,0°C), anorexia y esplenomegalia. Todos los perros presentaron anemia y trombocitopenia. Los valores de hematocrito obtenidos variaron entre 17 % y 31 % (valores normales: 37-55 %) con concentraciones de hemoglobina que oscilaron entre 5,8 g/dL y 11 g/dL (valores normales: 12-18 g/dL). El recuento plaquetario reveló valores que variaron entre 14×10^3 a 125×10^3 plaquetas/mm³ (valores normales: 150×10^3 - 500×10^3 plaquetas/mm³). En 16,7 % de los perros se observó leucopenia y en el mismo porcentaje se presentó leucocitosis. El resto de los perros (66,7 %) mantuvo un conteo leucocitario dentro de los valores normales (valores normales: 6×10^3 - 17×10^3 leucocitos /mm³). El recuento diferencial fue muy variable.

En los FCB de todos los perros se observaron las características inclusiones basófilas intracitoplasmáticas (púrpura o azul oscuro) en células mononucleares (Figura 1). La mayoría de las células infectadas contenían una sola inclusión, de forma redondeada u ovoide, de 2 a 5 μ m de diámetro.

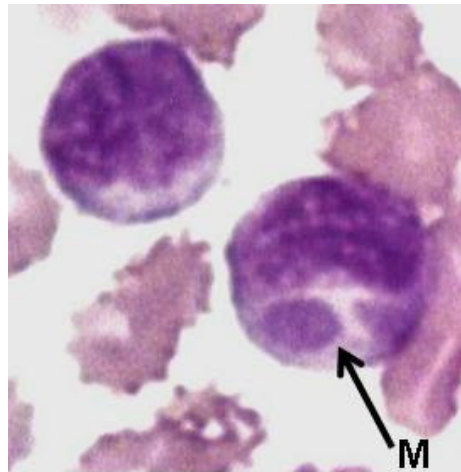


Figura 1. Frotis de Capa blanca donde se observa una inclusión basófila intracitoplasmática correspondiente a la mórula (M) en un linfocito. Coloración de Giemsa modificada (Hemacolor de Merk). 1000X

RCP anidada. En la primera RCP se observó un fragmento de aproximadamente 483 pb con el control positivo. Todas las muestras de ADN de los perros a excepción del perro N° 9 formaron este mismo fragmento. El ADN de *E. coli* resultó en un fragmento de 518 pb (Figura 2).

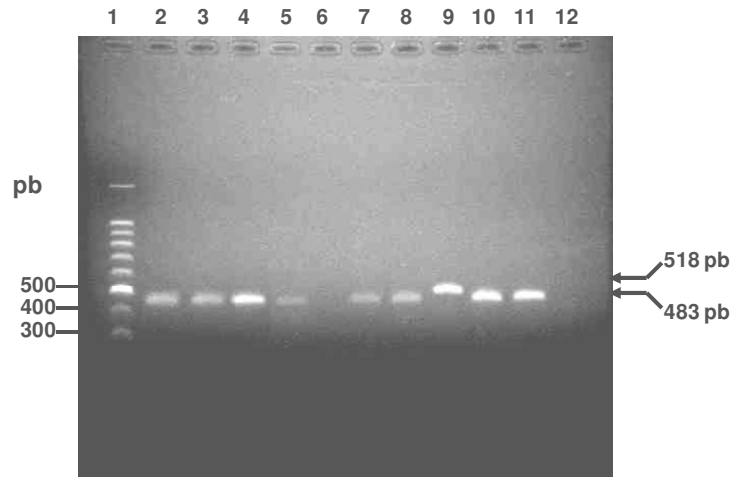


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la RCP obtenidos después de la amplificación de diferentes muestras de ADN utilizando los cebadores ECB/ECC. Canal 1: marcador de 100 pares de base (pb); canal 2: perro N° 1; canal 3: perro N° 2; canal 4: perro N° 4; canal 5: perro N° 6; canal 6: perro N° 9; canal 7: perro N° 10; canal 8: perro N° 12; canal 9: ADN de *E. coli*; canal 10: células DH82 infectadas con *E. canis*; canal 11: células DH82 infectadas con *E. chaffeensis*; canal 12: ADN de perro sano (control negativo).

En la segunda RCP, utilizando los cebadores específicos para *E. canis* ("canis"/HE3), se obtuvo con el control positivo un fragmento de aproximadamente 388 pb. En las muestras analizadas de todos los perros se observó esta misma banda (Figura 3A). Al emplear los cebadores específicos para la especie *E. chaffeensis* (HE1/HE3) se evidenció con el control positivo un fragmento del mismo tamaño al anterior, es decir de 388 pb. De las muestras de los perros ensayadas se obtuvo esta misma banda en el perro N° 4, N° 6, N° 9 y N° 10 (Figura 3B), correspondiente al 33,3 %.

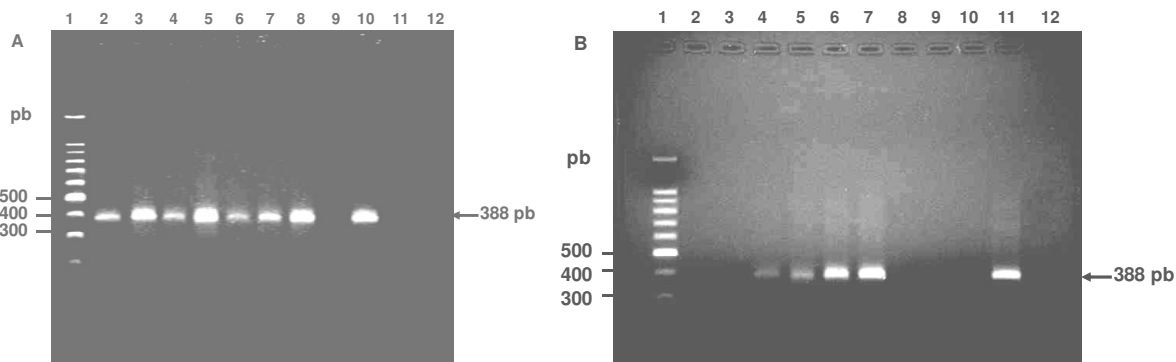


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la RCP obtenidos después de la amplificación de diferentes muestras de ADN utilizando los cebadores "canis"/HE3 (A) y H1/H3 (B). Canal 1: marcador de 100 pares de base (pb); canal 2: perro N° 1; canal 3: perro N° 2; canal 4: perro N° 4; canal 5: perro N° 6; canal 6: perro N° 9; canal 7: perro N° 10; canal 8: perro N° 12; canal 9: ADN de *E. coli*; canal 10: células DH82 infectadas con *E. canis*; canal 11: células DH82 infectadas con *E. chaffeensis*; canal 12: ADN de perro sano (control negativo).

DISCUSIÓN

La ehrlichiosis monocítica canina es una enfermedad ampliamente reportada en el mundo. Entre las anormalidades hematológicas más resaltantes está la trombocitopenia y en algunas ocasiones se puede presentar anemia y leucopenia (10). La totalidad de los animales de este estudio (100 %) presentaron anemia y trombocitopenia. Estos resultados difieren de los reportados en un estudio realizado en Luisiana (Estados Unidos), en el cual encontraron anemia en 72 % y trombocitopenia en 64 % de los perros (15). Por otro lado, los porcentajes presentados en esta investigación coinciden con los reportados en un estudio realizado en Grecia (16). La igualdad y diferencia encontrada entre los valores porcentuales de estos estudios, puede deberse a variaciones en el grado de virulencia de cepas en regiones geográficas distintas, tal como queda expresado en el trabajo de Kuehn y Gaunt, 1985 (15). Sería conveniente realizar una investigación con un número mayor de perros con signos clínicos de ehrlichiosis monocítica canina utilizando la RCP como método diagnóstico, incluyendo entre las variables los parámetros hematológicos.

Debido a que es imposible diferenciar *E. canis* y *E. chaffeensis* en FCB (ambas bacterias tienen tropismo por células mononucleares), se identificó molecularmente la especie *E. canis* mediante la RCP en todas las muestras. Este resultado era el esperado, ya que los signos clínicos, datos hematológicos y observación de mórulas intracitoplasmáticas en células mononucleares así lo indicaban; las características morfológicas de las mórulas intracitoplasmáticas coincidieron con las descritas en otras investigaciones (17-19).

Ehrlichia canis ha sido reportada en caninos domésticos y salvajes en casi todo el mundo, especialmente en regiones tropicales y subtropicales (20). 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 y así lo han demostrado diferentes estudios publicados desde 1992 (18, 21, 22).

Desde el año 1996, ha surgido un interés especial por la especie *E. canis*, ya que se reportó el aislamiento y caracterización de una nueva cepa *Ehrlichia* humana Venezolana (EHV) a partir de un paciente asintomático (23); esta misma cepa también se encontró en perros y la definieron como *Ehrlichia* de perros Venezolana (EDV) (21). Este interés ha aumentado desde el año 2006 porque se notifica acerca de 6 pacientes con sintomatología de ehrlichiosis monocítica humana a quienes se les diagnosticó por RCP *E. canis* y luego por secuenciación llegaron a la conclusión de que se trata de la misma cepa EHV y EDV reportada antes (6). La alta frecuencia de *E. canis* encontrada en nuestro estudio y su implicación en causar sintomatología en humanos le da importancia al estudio clínico, molecular y epidemiológico de esta nueva zoonosis, cuyo reservorio natural podría ser el perro.

En este estudio 33,3 % de los perros estuvo coinfectado con *E. chaffeensis*, agente causal de la ehrlichiosis monocítica humana, enfermedad ampliamente descrita en Estados Unidos (24-26) y poco reseñada en otros países (27). En Estados Unidos está establecido que el venado de cola blanca (*Odocoileus*

virginalis) es el reservorio natural, la garrapata *Amblyoma americanum*, el vector y el humano y el perro lo describen como reservorios accidentales (12).

En estudios anteriores realizados en Venezuela se había reportado por RCP *E. chaffeensis* en un niño (27) y en un perro (14). El presente estudio permite reforzar las publicaciones anteriores al confirmar una vez más la presencia de *E. chaffeensis* en nuestro país en un número importante de perros. Queda por aclarar el papel del perro y el humano en esta probable zoonosis, si hay otro animal implicado y el vector involucrado. La presente investigación pone de manifiesto dos agentes importantes (*E. canis* y *E. chaffeensis*) que durante su ciclo de vida pueden involucrar al hombre. Se hace necesario estudiar nuevos casos humanos a fin de caracterizar clínicamente las enfermedades y evidenciar el papel del perro en estas zoonosis.

AGRADECIMIENTOS. Los autores agradecen a la Dra Jacqueline Dawson, del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, Atlanta, Georgia) y a la Dra. Cruz María Arraga de Alvarado de la Universidad del Zulia por facilitar la línea celular DH82 infectada con *E. canis* y *E. chaffeensis*.
Financiamiento: Proyecto 96-014 del Consejo para el Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC).

BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. J Clin Microbiol. 1991;29(12):2838-42.
2. Anderson BE, Sumner JW, Dawson JE, Tzianabos T, Greene CR, Olson JG et al. Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1992;30(4):775-80.
3. Arraga-Alvrado C. Ehrlichiosis canina en Maracaibo, Estado Zulia-Venezuela: reporte de 55 casos. Rev Cient Universidad del Zulia. 1992;2(Suppl 2):41-52.
4. Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. J Clin Microbiol. 1998;36(9):2645-51.
5. Carter GB, Seamer J, Snape T. Diagnosis of tropical canine pancytopenia (*Ehrlichia canis* infection) by immunofluorescence. Res Vet Sci. 1971; 12: 318-22.
6. Dawson JE, Biggie KL, Warner CK, Cookson K, Jenkins S, Levine JF et al. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. Am J Vet Res. 1996;57(8):1175-9.
7. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC et al. 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 combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51(Pt 6):2145-65.
8. Dumler JS, Chen SM, Asanovich K, Triggiani E, Popov VL, Walker DH. Isolation and characterization of a new strain of *Ehrlichia chaffeensis* from a patient with nearly fatal monocytic ehrlichiosis. J Clin Microbiol. 1995;33(7):1704-11.
9. Fishbein DB, Kemp A, Dawson JE, Greene NR, Redus MA, Fields DH. Human ehrlichiosis: prospective active surveillance in febrile hospitalized patients. J Infect Dis. 1989;160(5):803-9.
10. Fishbein DB, Sawyer LA, Holland CJ, Hayes EB, Okoroanyanwu W, Williams D et al. Unexplained febrile illnesses after exposure to ticks. Infection with an *Ehrlichia*? JAMA. 1987;257(22):3100-4.

11. Gutiérrez CN, Martínez M, Sánchez E, De Vera M, Rojas M, Ruiz J et al. Cultivation and molecular identification of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia chaffeensis* from a naturally co-infected dog in Venezuela. *Vet Clin Pathol*. 2008;37(3):258-65.
12. Gutiérrez N, Martínez M, Arraga-Alvarado C, Bretaña A, Pacheco I, Comach G. Ultrastructural identification of *Ehrlichia* sp in an experimentally infected dog in Venezuela. *Invest Clin*. 1999;40(3):165-77.
13. Harrus S, Bark H, Waner T. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. *Compend Contin Edu Pract Vet*. 1997;19(4): 431-44.
14. Kuehn NF, Gaunt SD. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. *JAVMA*. 1985;186(4):355-58.
15. Martínez MC, Gutiérrez CN, Monger F, Ruiz J, Watts A, Mijares VM et al. *Ehrlichia chaffeensis* in child, Venezuela. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(3):519-20.
16. McQuiston JH, McCall CL, Nicholson WL. Ehrlichiosis and related infections. *J Am Vet Med Assoc*. 2003;223(12):1750-6.
17. Parola P, Davoust B, Raoult D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res*. 2005;36(3):469-92.
18. Perez M, Bodor M, Zhang C, Xiong Q, Rikihisa Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1078:110-7.
19. Perez M, Rikihisa Y, Wen B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J Clin Microbiol*. 1996;34(9):2133-9.
20. Rikihisa Y. The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. *Clin Microbiol Rev*. 1991;4(3):286-308.
21. Siarkou VI, Mylonakis ME, Bourtzi-Hatzopoulou E, Koutinas AF. Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. *Vet Microbiol*. 2007;125(3-4):304-12.
22. Simpson CF. Structure of *Ehrlichia canis* in blood monocytes of a dog. *Am J Vet Res*. 1972;33(12):2451-4.
23. Suksawat J, Pitulle C, Arraga-Alvarado C, Madrigal K, Hancock SI, Breitschwerdt EB. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. *J Clin Microbiol*. 2001;39(1):90-3.
24. Talbot TR, Comer JA, Bloch KC. *Ehrlichia chaffeensis* infections among HIV-infected patients in a human monocytic ehrlichiosis-endemic area. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(9):1123-7.
25. Unver A, Perez M, Orellana N, Huang H, Rikihisa Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. *J Clin Microbiol*. 2001;39(8):2788-93.
26. Yu DH, Li YH, Yoon JS, Lee JH, Lee MJ, Yu IJ et al. *Ehrlichia chaffeensis* infection in dogs in South Korea. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008;8(3):355-8.
27. Yu XJ, McBride JW, Walker DH. Restriction and expansion of *Ehrlichia* strain diversity. *Vet Parasitol*. 2007;143(3-4):337-46.