



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“ANÁLISIS SEROLÓGICO DE ENFERMEDADES ZONÓTICAS TRANSMITIDAS
POR GARRAPATAS EN ROEDORES SILVESTRES”.**

TESIS INDIVIDUAL

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PRESENTA:

LORENA LARA OLVERA

DIRIGIDO POR:

DRA. GABRIELA AGUILAR TIPACAMÚ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. JUNIO 2016.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**



**“ANÁLISIS SEROLÓGICO DE ENFERMEDADES ZONÓTICAS TRANSMITIDAS
POR GARRAPATAS EN ROEDORES SILVESTRES”.**

TESIS INDIVIDUAL

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PRESENTA:

LORENA LARA OLVERA

DIRIGIDO POR:

DRA. GABRIELA AGUILAR TIPACAMÚ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. JUNIO 2016.



**Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia**



“Análisis serológico de enfermedades zoonóticas transmitidas por garrapatas en roedores silvestres”.

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presenta:

Lorena Lara Olvera

Dirigido por:

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú

Sinodales:

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú

Presidente

Firma

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Secretario

Firma

Dra. Andrea Olvera Ramírez

Vocal

Firma

M. en C. Mario Hidalgo Ruiz

Suplente

Firma

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Directora

Facultad Ciencias Naturales

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Junio 2016.

RESUMEN

El humano siempre ha estado en contacto con la naturaleza, pero debido a la explosión demográfica ha ido habitando en nuevos espacios, lo cual aunado a los cambios climáticos y a la adaptación de vectores artrópodos a distintos ambientes, incrementa la interacción y con esto el riesgo de infecciones zoonóticas causadas por bacterias intracelulares transmitidas por garrapatas, como la Anaplasmosis Granulocítica Humana, la Ehrlichiosis Monocítica Canina, la Enfermedad de Lyme y la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas. Estas patologías han tomado importancia recientemente debido al incremento en los casos diagnosticados y así como a su emergencia y/o reemergencia a nivel mundial. Dichas infecciones se mantienen en el ambiente por medio de hospedadores reservorios y los roedores silvestres son los de mayor importancia. En la presente investigación se analizaron por Inmunofluorescencia Indirecta 92 sueros de roedores silvestres capturados en la Sierra de Querétaro, con el fin de encontrar anticuerpos específicos contra *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* y *Rickettsia rickettsii*, el 100% de los sueros resulto positivo tanto para *A. phagocytophilum*, como para *E. canis*, y negativo para *B. burgdorferi* y *R. rickettsii*. Ésta técnica puede presentar reacción cruzada entre los anticuerpos que resultaron positivos, por lo que se deben analizar los sueros problema por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, con el fin de establecer certeramente los patógenos circulantes entre la población de roedores silvestres estudiada, e implementar medidas preventivas como medio de control para evitar infecciones entre la población que se encuentra en riesgo.

Palabras clave: Anaplasmosis Granulocítica Humana, Ehrlichiosis Monocítica Canina, Enfermedad de Lyme, Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas.

SUMMARY

The human has always been in contact with nature, but because of the population explosion has been occupying new spaces, which coupled with climate change and the adaptation of arthropod vectors to different environments, increases the interaction and thus the risk of zoonotic infections caused by intracellular bacterium transmitted by ticks, such as Human Granulocytic Anaplasmosis, Canine Monocytic Ehrlichiosis, Lyme disease and Spotted Fever of Rocky Mountains. These diseases have taken importance recently due to the increase in diagnosed cases and as well as it's emergence and / or reemergence worldwide. Such infections are kept in the environment through reservoirs host and the wild rodents are the most important. In this research were analyzed by indirect immunofluorescence 92 sere from wild rodents captured in the Mountain range of Queretaro, in order to find specific antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia rickettsii*, 100 % of the sere tested positive for *A. phagocytophilum* both, as to *E. canis*, and negative for *B. burgdorferi* and *R. rickettsii*. This technique can cross-react between antibodies that were positive, so to be analyzed the problem sere using the technique of polymerase chain reaction, in order to accurately establish waterborne pathogens in the population studied wild rodents and implement preventive measures as a means of control to prevent infection among the population that is at risk.

Keywords: Human Granulocytic Anaplasmosis, Canine Monocytic Ehrlichiosis, Lyme Disease, Spotted Fever of Rocky Mountains.

ABREVIACIONES UTILIZADAS

A: Anticuerpo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNs: Ácido ribonucleico ribosomal

A: *Anaplasma*

B: *Borrelia*

Bbsl: Borrelia Burgdorfer sensu lato

*Bbse: Borrelia Burgdorfer sensu
estricto*

E: *Ehrlichia*

EGH: Ehrlichiosis Granulocítica
Humana

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic
acid

EMC: Ehrlichiosis Monocítica Canina

EL: Enfermedad de Lyme

EUA: Estados Unidos de Norte
América

FFMR: Fiebre Manchada de las
Montañas Rocosas

g: Gramo

HL-60: Human promyelocytic
leukemia cells

hr: Hora

HRP:

IF: Inmunofluorescencia

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta

Ig: Inmunoglobulina

IgA: Inmunoglobulina A

IgG: Inmunoglobulina G

IM: intramuscular

LAMP: Amplificación isotérmica
mediada por horquillas.

LCR: Líquido ceforraquídeo

min: Minuto

mg: Miligramo

OMS: Organización Mundial de la
Salud

Vmrd: Veterinary Medical Research &
Development

PCR: Reacción en cadena de la
polimerasa

R: *Rickettsia*

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: reacción en cadena de la
polimerasa

pH: potencial de Hidrógeno

Spp: Especie

µg: Microgramo

µl: Microlitro

DEDICATORIAS

A los seres que tienen plena confianza de que mi curiosidad por conocer y explicarme las extrañas interconexiones de la energía generadora y destructora del todo me puede llevar por senderos que culminaran en lugares de conocimiento infinito que será beneficioso para mi entorno.

A mi Madre, que no sabía el paquete que se aventaba cuando decidió traerme a éste mundo, pero aun así no deja de echarle ganas estando a mi lado a pesar de las adversidades.

Al Doctor Juan Joel Mosqueda Gualito por introducirme en el mundo de la biología molecular, logrando que su búsqueda de conocimiento me inspirará y despertará en mí el interés en ésta rama y por confiar en mi persona.

A Simón, Xibalaba y Cthulhu por estar conmigo aguantando mi estrés y mis cambios de humor, por desvelarse conmigo y por ser uno de los más grandes motivos que me incitan a siempre continuar.

A quienes nunca han confiado en mi persona, ya sea porque les desagrada mi ser o porque simplemente creen que mi pensamiento tan disperso nunca llegará a nada en concreto.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Gabriela Aguilar Tipacamú por acceder a ser mi director de tesis y por estar conmigo hasta el final de este largo y sinuoso camino.

A Susana Lucía Sosa Gallegos por su sencillez para explicarme procesos de laboratorio que sólo conocía en teoría cuando llegue al laboratorio de Microbiología.

A la Doctora Andrea Margarita Olvera Ramírez por ser parte de mi comité y realmente tomarse ese papel, por escucharme y darme ánimos para seguir.

A Mario Hidalgo Ruíz por estar a mi lado asesorándome de manera precisa y paciente a lo largo del análisis serológico del presente trabajo.

A la Doctora Bertha Carvajal Gámez por compartirme de forma precisa conocimientos que me facilitaron la realización del presente trabajo.

Al Doctor Juan Joel Mosqueda Gualito por tomarse el tiempo de buscar entre su amplio conocimiento el camino más adecuado a seguir cuando nada parecía salir bien, y por alentarme a continuar haciendo hincapié en que la investigación es impredecible, por lo que nunca se debe dejar de insistir y de buscar cómo llegar a lo que deseas.

A grandes mujeres que admiro mucho y que dedican su vida a la ciencia, a las que agradezco que me dedicaran un poco de su valioso tiempo para orientarme en los momentos que más lo requería: Teresa de Jesús García Gasca, Tercia Cesaria Réis de Souza.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
SUMMARY.....	ii
ABREVIACIONES UTILIZADAS.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1. Enfermedades de tipo zoonótico.....	2
2.2. Garrapatas vector.....	2
2.2.1. Familia Ixodidae.....	3
2.2.2. Morfología de las garrapatas de la familia Ixodidae.....	5
2.2.3. Ciclo biológico de las garrapatas de la familia Ixodidae.....	6
2.3. Biología de los patógenos y enfermedades que causan.....	7
2.3.1. <i>Anaplasma Phagocytophilum</i>	7
2.3.1.1. Ehrlichiosis Granulocítica Humana (EGH).....	9
2.3.2. <i>Borrelia Burgdorferi</i> sensu lato.....	12
2.3.2.1 Enfermedad de Lyme.....	13
2.3.3. <i>Ehrlichia canis</i>	15
2.3.3.1. Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC).....	16
2.3.4. <i>Rickettsia Rickettsii</i>	17

2.3.4.1. Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR).....	18
2.4.1. Técnicas diagnósticas.....	21
2.4.1. Inmunofluorescencia.....	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVO GENERAL.....	25
6. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	25
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7.1. Área de estudio.....	26
7.2. Colecta de roedores y obtención de sangre.....	26
7.3. Procesamiento de las muestras.....	27
7.4. Análisis de los sueros por Inmunofluorescencia Indirecta.....	28
8. RESULTADOS.....	31
9. DISCUSIÓN.....	36
10. CONCLUSIÓN.....	39
11. ANEXOS.....	41
Anexo 1. Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta.....	41
Anexo 2. Imágenes obtenidas por IFI para los distintos patógenos.....	48
Anexo 3. Estandarización de la Inmunofluorescencia.....	59
12. Bibliografía.....	61

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Clasificación taxonómica de las garrapatas.....	3
Cuadro 2.2. Garrapatas de importancia veterinaria.....	4
Cuadro 2.3. Morfología de las garrapatas.....	5
Cuadro 2.4. Características clínicas de la enfermedad de Lyme (EL).....	14
Cuadro 2.5. Tipos de técnicas de Inmunofluorescencia (IFI).....	22
Cuadro 2.6. Ventajas y desventajas de IFI.....	23
Cuadro 7.1. Reactivos para IFI.....	28
Cuadro 8.1. Resultados de IFI en sueros de roedores silvestres.....	31
Cuadro 11.1.1. Suero búfer diluyente (pH 7.2).....	46
Cuadro 11.1.2. 4XFA Buffer de Enjuague (pH 9-9.5).....	47
Cuadro 11.1.3. Preparación del buffer de enjuague y buffer de dilución.....	47
Cuadro 11.2.1. Controles positivos de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	48
Cuadro 11.2.2. Controles negativos de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	48
Cuadro 11.2.3. Sueros de roedores positivos para <i>A. phagocytophilum</i>	48
Cuadro 11.2.4. Controles Positivos de <i>Borrelia burgdorferi</i>	52
Cuadro 11.2.5. Controles Negativos de <i>Borrelia burgdorferi</i>	52
Cuadro 11.2.6. Sueros de <i>Borrelia burgdorferi</i>	52
Cuadro 11.2.7. Controles positivos de <i>Ehrlichia canis</i>	53
Cuadro 11.2.8. Controles negativos de <i>Ehrlichia canis</i>	53
Cuadro 11.2.9. Sueros de roedores positivos para <i>Ehrlichia canis</i>	53
Cuadro 11.2.10. Controles Positivos de <i>Rickettsia rickettsii</i>	58
Cuadro 11.2.11. Controles Negativos de <i>Rickettsia rickettsii</i>	58
Cuadro 11.2.12. Sueros de <i>Rickettsia rickettsii</i>	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Morfología de las garrapatas.....	5
Figura 2.2. Morfología de las garrapatas.....	5
Figura 2.3. Morfología de las garrapatas.....	5
Figura 2.4. Ciclo de vida de las garrapatas.....	6
Figura 2.5. Filodendograma de la Familia Anaplasmataceae basado en la secuencia del gen ARNr 16s.....	8
Figura 2.6. Reacción de IFI.....	22
Figura 7.1 Ubicación geográfica del municipio de Jalpan de Serra.....	27
Figura 8.1. Control Negativo <i>A. phagocytophilum</i>	32
Figura 8.2. Control Positivo <i>A. phagocytophilum</i>	32
Figura 8.3. Sueros analizados por IFI para <i>A. phagocytophilum</i>	32
Figura 8.4. Control Negativo <i>B. burgdorferi</i>	33
Figura 8.5. Control Positivo <i>B. burgdorferi</i>	33
Figura 8.6. Sueros analizados por IFI para <i>B. burgdorferi</i>	33
Figura 8.7. Control Negativo <i>R. rickettsii</i>	34
Figura 8.8. Control Positivo <i>R. rickettsii</i>	34
Figura 8.9. Sueros analizados por IFI para <i>R. rickettsii</i>	34
Figura 11.1.1. Dilución de los sueros problema.....	41
Figura 11.1.2 Atemperación de laminillas.....	42
Figura 11 1.3. Sueros problema y controles.....	42
Figura 11 1.4. Incubación de laminillas.....	42
Figura 11.1.5. Buffer de enjuague remojando laminilla.....	43
Figura 11.1.6. Tinción con el Anti-IgG Alexa fluor 488.....	43
Figura 11.1.7. Incubación de laminilla.....	44
Figura 11.1.8. Remoje con buffer de enjuague.....	44
Figura 11.1.9. Drenaje y aplicación de líquido de montaje.....	45
Figura 11.1.10. Observación de IFI en 100X.....	45
Figura 11.1.11. Pesaje de reactivos para buffers.....	46

1. INTRODUCCIÓN.

El humano siempre ha estado en contacto con la naturaleza pero debido a la explosión demográfica mundial; nuevos espacios han sido ocupados, aumentando la interacción entre humanos, animales domésticos y animales silvestres. Aunado al cambio climático, y la rápida adaptación de los vectores y reservorios a nuevos ambientes, se han aumentado las posibilidades de adquirir alguna enfermedad zoonótica transmitida por artrópodos hematófagos como las garrapatas (Rodríguez *et al.*, 2005; Álvarez y Bonilla 2007).

Estas enfermedades zoonóticas han despertado el interés para la salud pública a nivel mundial, debido al incremento repentino en los casos confirmados y las dificultades en el diagnóstico, la prevención y el control. Recientemente se ha incrementado la importancia ciertas enfermedades emergentes y/o re-emergentes transmitidas por garrapatas; como es el caso de las Ehrlichiosis (*Anaplasma phagocytophilum*, y *Ehrlichia canis*), la enfermedad de Lyme (*Borrelia Burgdorferi*) y las Rickettsiosis (*Rickettsia rickettsii*), las cuales registran una elevada morbilidad debido a la presencia de cuadros clínicos atípicos, la incidencia de los casos, y sobre todo a la extensa distribución y especificidad de sus vectores. (Bakken y Dumler, 2000; Dumler y Walker, 2001).

Por lo antes mencionado, y considerando que los principales hospederos reservorios son los roedores, los cuales, además de tener una distribución cosmopolita, también se encuentran estrechamente relacionados al hombre y sus actividades; es posible que dicha interacción tenga la capacidad de generar un foco de infección de grandes dimensiones debido a la falta de vacunas eficaces disponibles. (Parola *et al.*, 2005; Collinge y Ray, 2006; Pérez-Osorio *et al.*, 2008).

Por lo anteriormente citado el objetivo del presente trabajo fue Identificar mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta la presencia de anticuerpos contra cuatro patógenos de importancia zoonótica (*Anaplasma Phagocytophila*, *Borrelia Burgdorferi*, *Ehrlichia Canis*, y *Rickettsia Rickettsii*) en suero de roedores silvestres de la sierra de Querétaro. De ésta manera se pueden tomar medidas de prevención y control para proteger a la población en riesgo.

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1. Enfermedades de tipo zoonótico.

Las enfermedades infecciosas emergentes actuales y antañas en su gran mayoría suelen ser zoonosis (Brown, 2003; Krauss *et al.*, 2003). El termino zoonosis hace referencia a que los patógenos implicados en la enfermedad poseen un reservorio animal, el cual generalmente es asintomático, el patógeno en cuestión se transmite a los animales y también al humano. En la mayoría de las zoonosis se requiere un reservorio silvestre para su persistencia en un área geográfica específica (Pavlovsky, 1964; Collinge y Ray, 2006).

El 62% de los patógenos humanos tienen un origen zoonótico y debido a los cambios antropogénicos de la biosfera es que los patógenos de origen animal conforman la mayoría de las enfermedades emergentes actuales (Daszak, *et al.*, 2001; Weiss, 2001; Woolhouse, 2006).

2.2. Garrapatas vectores.

Se conocen alrededor de 15.000 especies de artrópodos hematófagos distribuidas en 400 géneros (Ribeiro, *et al.*, 1989). Las garrapatas son ácaros que succionan sangre de sus hospederos vertebrados, alternando entre etapas de vida libre y de vida parasitaria, durante su ciclo de vida pasan por cuatro estadios: huevo, larva, ninfas y adulto. Exceptuando los huevos, los demás estadios de desarrollo se caracterizan por ser parásitos hematófagos. Tienen una distribución mundial con mayor abundancia en regiones tropicales y subtropicales principalmente, aunque con la movilización de animales han logrado llegar a nuevas zonas de distintas variedades climáticas, logrando establecerse endémicamente sin problemas; por lo que son de gran importancia no solo para el sector ganadero, sino también para la población susceptible en general. En el hospedero en turno suelen generarle varias afecciones, entre las que se encuentran: irritación, alergias, anemias, e inclusive la muerte en infestaciones masivas, además de que son un factor predisponente para

miasis o infecciones bacterianas secundarias. El más grave daño generado por estos organismos se debe a que fungen como vectores de microorganismos que generan graves enfermedades en los hospederos (Junquera, 2015; Horak, *et al*, 2002).

2.2.1. Familia Ixodidae

La clasificación taxonómica de las garrapatas (Cuadro 2.1) las divide en tres familias: Ixodidae (garrapatas duras), Argasidae (garrapatas blandas) y Nuttalliellidae (intermedia entre blandas y duras, tiene solo una especie). La familia de importancia veterinaria es la Ixodidae (Cuadro 2.2), que posee doce géneros (*Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* y *Rhipicephalus*), un subgénero (*Boophilus*), y 683 especies (Cordero del campillo, *et al.*, 1999; Horak, *et al*, 2002).

Cuadro 2.1. Clasificación Taxonómica de las Garrapatas.	
Reino	Animal
Phylum	Arthropoda
Sub-phylum	Chelicerata
Clase	Arachnida
Grupo	Parasitiformes
Orden	Acarina
Sub-orden	Ixodoidea
Familia	Ixodidae
Géneros	<i>Amblyomma</i> , <i>Bothriocroton</i> , <i>Dermacentor</i> , <i>Haemaphysalis</i> , <i>Hyalomma</i> , <i>Ixodes</i> , <i>Nosomma</i> , <i>Rhipicentor</i> y <i>Rhipicephalus</i> .

(Cordero del campillo, *et al.*, 1999).

Cuadro 2.2. Especies de garrapatas de importancia veterinaria.

Familia	Género	Hospederos Domésticos
<i>Ixodidae</i>	<i>Amblyomma</i>	Bovinos, Caninos, Caprinos, Equinos, Felinos, Ovinos, Porcinos.
	<i>Dermacentor</i>	Bovinos, Caninos, Caprinos, Equinos, Felinos, Ovinos, Porcinos.
	<i>Haemaphysalis</i>	Bovinos, Caninos, Caprinos, Equinos, Felinos, Ovinos, Porcinos.
	<i>Hyalomma</i>	Bovinos, Caninos, Caprinos, Equinos, Felinos, Ovinos, Porcinos.
	<i>Ixodes</i>	Bovinos, Caninos, Caprinos, Equinos, Felinos, Ovinos, Porcinos.
	<i>Rhipicephalus</i>	Bovinos, Caninos, Caprinos, Equinos, Felinos, Ovinos, Porcinos.

(Horak *et al*, 2002; Junquera, 2015).

2.2.2. Morfología de las garrapatas de la Familia Ixodidae.

Las garrapatas son ácaros con cuerpo comprimido dorsoventralmente de 2 a 20 mm de longitud y dividido en gnatosoma (capítulo) e idiosoma (figura 2.1 y 2.2). El capítulo (figura 2.3) es la parte anterior y en ella se encuentran la probóscide y estructuras circundantes (quelíceros bisegmentados envainados e hipostoma) y dos palpos sensoriales laterales tetrasegmentados. Los palpos (Figura 2.3) tienen disminuido el cuarto artejo y presentan sedas sensoriales. El extremo de los quelíceros se mueve adelante o atrás para cortar la piel. Las coxas de los palpos están fusionadas, formando el capítulo. La parte ventral anterior de la base del capítulo se extiende hacia delante formando el hipostoma, que tiene denticulación en la zona de contacto con la piel. Los dientes de las filas del hipostoma (Figura 2.3) se dirigen hacia la porción posterior de la garrapata para sujetarse. El dorso de la base del capítulo de las hembras posee glándulas que segregan feromonas (Márquez, *et al.*, 2005).

Cuadro 2.3. Morfología de las Garrapatas.



Figura 2.1. *Rhipicephalus sanguineus* (hembra) en vista ventral: 1, capítulo; 2, idiosoma; 3, orificio genital; 4, placa respiratoria; 5, surco anal (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005).

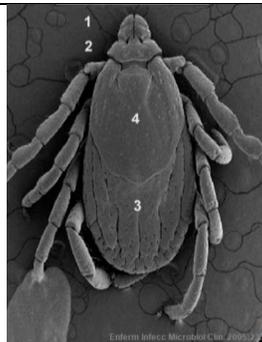


Figura 2.2. *Rhipicephalus sanguineus* (hembra) en vista dorsal: 1, capítulo; 2, base del capítulo con áreas porosas; 3, idiosoma; 4, escudo (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005).

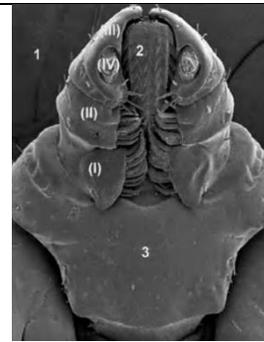


Figura 2.3. *Rhipicephalus sanguineus* (hembra), capítulo en vista ventral: 1, Palpos de cuatro artejos (I-IV); 2, hipostoma; 3, base del capítulo (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005).

2.2.3. Ciclo biológico de las garrapatas de la Familia Ixodidae.

El ciclo biológico varía de una especie a otra, en función de la etología del hospedero y de las condiciones climáticas. En general suele durar de 1 a 3 años, y se puede interrumpir por diapausas, las cuales raramente ocurren en la etapa de huevo, pero en los demás estadios dichas bajas metabólicas pueden durar más de un año, disminuyéndose el voltinismo. Estudios acerca de la biología y reproducción de éstos parásitos han descrito al menos tres tipos de ciclo de vida como se describe a continuación (Rojas, 2001; Gállego, 2007).

- Ciclo clásico (trifásico): Requiere tres hospederos. Se alimentan una vez por cada estadio hasta repletarse y caer al suelo donde mudan para posteriormente esperar un nuevo hospedero.
- Ciclo difásico: Necesitan dos hospederos para cada generación de garrapatas. En el hospedero número uno la larva muda a ninfa.
- Ciclo monofásico: Todas las mudas ocurren el mismo hospedero.

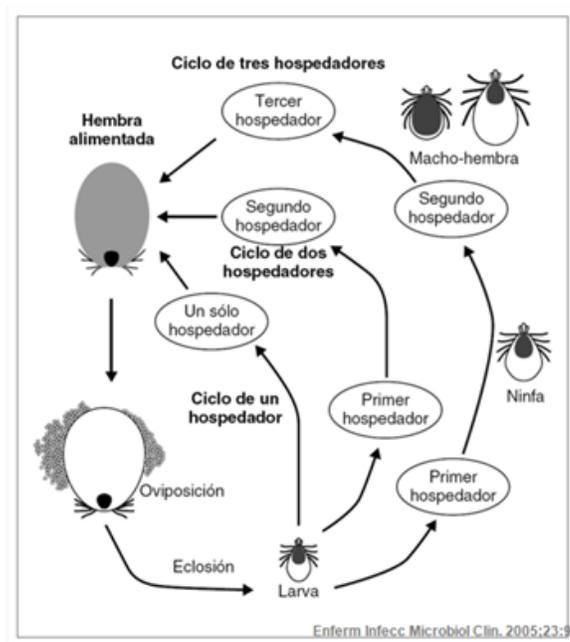


Figura 2.4 Ciclo de vida de las garrapatas (Márquez *et al.*, 2005).

2.3. Biología de los patógenos y enfermedades que causan.

Las enfermedades emergentes transmitidas por garrapatas tomaron mayor importancia en la década de 1990, debido a su alta incidencia y morbilidad (Bakken y Dumler, 2000; Dumler y Walker, 2001).

A través del tiempo, distintos microorganismos patógenos han evolucionado de tal forma que se ha adaptado eficazmente a los ambientes hostiles y han logrado generar nuevas estrategias para evadir el sistema inmune de sus hospederos; tal es el caso de los parásitos intracelulares, los cuales gracias al perfeccionamiento de mecanismos complejos han logrado sobrevivir replicándose de forma exitosa (Ettinger, 2007).

2.3.1. *Anaplasma phagocytophilum*.

Las ehrlichias son bacterias que están incluidas en el orden Rickettsiales. El género *ehrlichia* lo creó Moshkovski en 1945 para definir la familia Ehrlichieae del orden Rickettsiales (Euzéby, 2002).

La clasificación del orden Rickettsiales ha estado en constante cambio pero en 2001 se analizaron y compararon: el gen ARNr 16S, los genes del operón *groESL*, los genes de proteínas de superficie y el gen citrato sintasa *-gltA-* generándose dos propuestas taxonómicas, las cuales coinciden en omitir la división en tribus, así como en la eliminación de la tribu Ehrlichieae, sin embargo la distribución en géneros y familias difiere (Dumler *et al.*, 2001; Inokuma *et al.*, 2001a, 2001b).

El manual de Bergey propone tres familias: (i), familia Rickettsiaceae (géneros *Rickettsia*, *Orientia* y *Wolbachia*); (ii), familia Ehrlichieae (géneros *Ehrlichia*, *Aegyptionella*, *Anaplasma*, *Cowdria*, *Neorickettsia* y *Xenohaliopsis*) y (iii), familia Holosporaceae (Garriti, 2002).

Por su parte Dumler *et al.*, (2001) propone dos familias: familia Rickettsiaceae (géneros *Rickettsia* y *Orientia*) y familia Anaplasmataceae (géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* y *Wolbachia*). Dentro de esta segunda familia

los citados autores dividen a las especies en cuatro grupos genómicos, los cuales se muestran en la siguiente imagen.

- El grupo I: género *Ehrlichia* que incluye; *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* y *E. (Cowdria) ruminantium*.
- El grupo II: género *Anaplasma* que incluye; *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. (Ehrlichia) platys* y *A. (Ehrlichia) phagocytophila*.
- El grupo III: *Neorickettsia*, que incluye a *N. helminthoeca*, *N. (Ehrlichia) risticii* y *N. (Ehrlichia) sennetsu*.
- El grupo IV: género *Wolbachia*, que contiene una especie; *W. pipientis*.

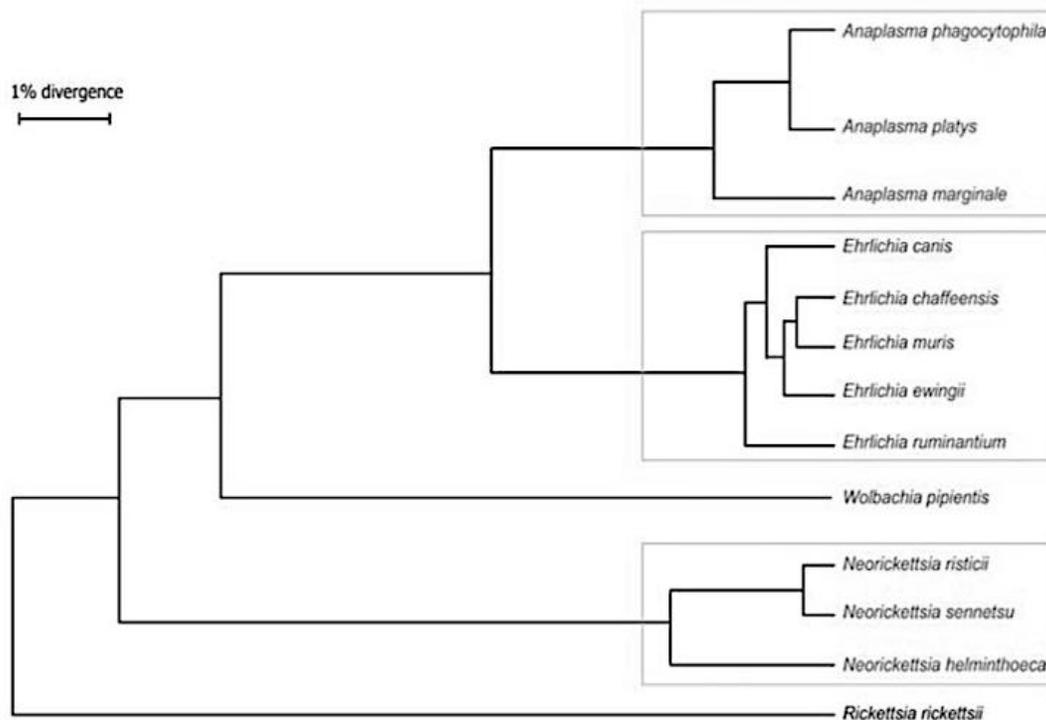


Figura 2.5. Filodendrograma de la familia Anaplasmataceae basado en la secuencia del gen ARNr 16S (Dumler et al., 2001).

En cuanto a la morfología los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* son demasiado similares, solo se diferencian por su preferencia de hospedadores y células que colonizan (Euzéby, 2002).

Las ehrlichias son cocos Gram negativos, generalmente redondeados, aunque suelen ser pleomórficos y de tamaño variable (0,2 - 1,5 μm). En la pared celular contienen poco peptidoglicano y en contraste con *Rickettsia spp.*, su membrana externa es fina y sin engrosamientos, además de que en *A. phagocytophilum* ésta membrana tiene pliegues que la distinguen de otras ehrlichias (Popov *et al.*, 1998).

Las ehrlichias son parásitos intracelulares estrictos y aerobios que infectan a los leucocitos del hospedero (*A. phagocytophila* ataca a los neutrófilos). Penetran en la célula blanco por mediada por receptores, posicionándose dentro de un endosoma citoplasmático en donde se multiplicará por fisión binaria, formando mórulas con dos tipos de células: pequeñas y electrodensas (0,2-0,4 μm) con ribosomas condensados al centro, las cuales se llaman “cuerpos elementales”, y otras grandes (0,8-1,5 μm), reticuladas y con los ribosomas en todo por todo el citoplasma, las que se conocen como “cuerpos reticulados”. No se sabe la causa de la formación de estos dos tipos de células, ya que ambas formas celulares se pueden multiplicar por fisión binaria (Dumler *et al.*, 2001). Las ehrlichias del endosoma burlan la destrucción evitando que el endosoma se una con el lisosoma (Rikihisa, 1999).

Anaplasma phagocytophilum se distribuye desde Canadá hasta China, muy similar a lo que ocurre *B. burgdorferi*. Sin embargo no en todos los países donde se ha registrado la presencia de *A. phagocytophilum* hay casos confirmados de EGH, lo cual se debe a infecciones asintomáticas y/o mal diagnóstico por inespecificidad del cuadro clínico (Bakken y Dumler, 2000; Dumler y Walker, 2001).

2.3.1.1. Ehrlichiosis Granulocítica Humana (EGH).

Las ehrlichiosis humanas se dividen en cuatro especies; *E. sennetsu*, *E. chaffensis*, *E. ewingii* y *Anaplasma phagocytophilum*. La primera se transmite por trematodos y las otras tres por garrapatas (Dumler y Walker, 2001).

La ehrlichiosis granulocítica humana (EGH) es una zoonosis que afecta los neutrófilos y es causada por *Anaplasma phagocytophilum*, especie que engloba lo que anteriormente se consideraban tres patógenos: *E. Phagocytophila*, *E. equi* y el agente de la EGH. *Anaplasma phagocytophilum* está distribuida en Europa, Norte América y Asia (Dumler *et al.*, 2001).

Se mantiene en un ciclo entre mamíferos hospederos y las garrapatas vector (*Ixodes spp.*), que están activas desde marzo hasta diciembre y hasta el 50% de *Ixodes scapularis* en EUA están infectados con *A. phagocytophilum* (Magnarelli *et al.*, 1995; Parola *et al.*, 2005).

Ciertos mamíferos fungen como reservorios, ejemplos de hospederos de éste tipo en EUA son: los pequeños roedores (*Peromyscus spp.*), las ratas de campo (*Rattus rattus*), las ardillas (*Sciurus spp.*, *Tamias senex*), mapaches (*Procyon lotor*), zarigüeyas (*Didelphis virginiana*), Zorrillos (*Mephitis mephitis*), y el venado de cola blanca (*O. virginianus*). En Europa los reservorios de mayor importancia son los pequeños mamíferos; el ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*), el topillo rojo (*Clethrionomys Glareolus*), la musaraña (*Sorex aranus*), el corzo (*Capreolus capreolus*), los zorros (*Vulpes vulpes*), y algunos animales domésticos como bovinos, caninos, equinos y ovinos (Telford *et al.*, 1996; Petrovec *et al.*, 2003).

Se describió por primera vez en Escocia transmitida por *Ixodes ricinus* a ovinos (Gordon *et al.*, 1932), se observó en neutrófilos y se le llamo *Rickettsia Phagocytophila* (Foggie, 1951) debido a diferencias morfológicas se reclasificó a *Cytoecetes phagocytophila* (Foggie, 1962). Posteriormente se eliminó ese género y se renombró como *Ehrlichia phagocytophila* en 1984 (Balows, 1975).

Al mismo tiempo ocurrieron casos en equinos, y el agente aislado fue nombrado *Ehrlichia equi* (Stannard *et al.*, 1969). Se descubrió que dicho agente era transmisible experimentalmente a caninos, felinos y primates (Lewis *et al.*, 1975), posible que los humanos se pudieran infectar. La garrapata vector es *Ixodes pacificus* en EUA (Ritcher *et al.*, 1996), e *Ixodes ricinus* en Europa (Parola *et al.*, 1998).

Paralelamente a los acontecimientos mencionados, también surgieron las primeras infecciones letales en humanos en EUA (Bakken *et al.*, 1994). La enfermedad se nombró ehrlichiosis granulocítica humana (EGH) y el patógeno responsable se denominó “agente de la EGH” (Chen *et al.*, 1994). Al secuenciar el gen ARNr 16S se corroboró que poseía homologías del 99.9% con *E. phagocytophila* y *E. equi*, señalándose que las tres especies en realidad son el mismo patógeno (Petrovec *et al.*, 1997).

La EGH es una infección bacteriana que simula a una infección viral. Posterior a la mordedura de garrapata el patógeno se incuba por 7-10 días. Las manifestaciones clínicas de la EGH no son específicas, y tiene dos tipos de presentación: la primera o subclínica suele ser asintomática, el tipo dos o infección aguda suele ser benigna en el grueso de la población pero severa y de pronóstico reservado en ancianos o inmunodeprimidos (Bakken y Dumler, 2000; Dumler y Walker, 2001; Olano y Walker, 2002).

La fase aguda se caracteriza por presentar trombocitopenia, leucopenia y elevado del nivel sérico de transaminasas hepáticas, lo que genera: malestar general, rigidez, mialgia, cefaleas y cuadro febril que supera los 39 ° C. alrededor del 11 % de los pacientes presentan erupciones cutáneas eritematosas, pero se cree que se deben a coinfecciones con otros patógenos transmitidos por garrapatas, como *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Bbsl*) (Bakken y Dumler, 2000).

Se debe tratar con Tetraciclina (cuatro veces al día) o Doxiciclina (dos veces al día) por quince días con excelentes resultados de recuperación máximo treinta días, aunque se suele utilizar con mayor frecuencia la Doxiciclina, debido a que en niños con dientes en crecimiento genera cambio en la coloración de los mismos. La dosis de Doxiciclina es de 100 mg en adulto y 2.2 mg/kg en niños, vía oral o parenteral, las Tetraciclinas se administran cuatro veces al día, con dosis de 500 mg en adulto y 25-50 mg/kg en niños, por las misma vías que la Doxiciclina. En casos de Alergias a los medicamentos de elección se utiliza Rifampicina 300 mg para adulto y 10 mg/kg para infantes, por vía oral dos veces al día (Dumler y Walker, 2001; Bakken *et al.*, 2002; Chapman *et al.*, 2006). Los casos con desenlace fatal

son menores al 1 % y suelen deberse a infecciones secundarias y/o casos con individuos inmunodeprimidos que presentan complicaciones respiratorias y/o hepáticas (Bakken y Dumler, 2008).

El diagnóstico es difícil debido a que se requiere células promielocíticas leucémicas HL-60, y se debe realizar en un laboratorio especializado. Los diagnósticos moleculares se basan en la técnica del PCR, pero dicho método es muy costoso. Por lo que la serología es la técnica más usada para el diagnóstico de dicho patógeno. Dentro de las pruebas serológicas la de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es la más empleada, aunque su limitación se debe a reacciones cruzadas entre *Ehrlichia* y *Anaplasma*, no obstante debido a la falta de una prueba específica y ante un cuadro clínico en humano indicativo de AGH un resultado positivo de IFI nos remite a la confirmación de tal enfermedad (Guerrero *et al.*, 2001; Inokuma *et al.*, 2001b).

2.3.2. ***Borrelia burgdorferi sensu lato (Bbsl).***

Borrelia burgdorferi es una espiroqueta Gram negativa, las espiroquetas son bacterias con forma de cilindro protoplásmico, miden entre 10-30 µm por 0.2-0.5, µm, curvadas espiral y con periplasma en su contorno, donde se insertan de 7 a 11 flagelos. Su genoma es muy pequeño (1.5 megabases) y se compone de un cromosoma lineal de 950 kilobases y 9 plásmidos lineales y 12 circulares supuestos que le adicionan 613 kilobases (Wang *et al.*, 1999).

Según la secuencia del gen ARNr 16S, el género *Borrelia* es un taxón casi homogéneo, que incluye 37 especies y la mayoría son patógenas para las personas y para los animales domésticos, las especies que causan la enfermedad de Lyme se conocen como *Borrelia burgdorferi sensu lato*, las cuales son un complejo por varios grupos genómicos (Schwan y Piesman, 2002).

Sus diferencias entre geno-especies se basa en secuencias de loci cromosomales conservados como: el espaciador intergénico *rrfA-rrlB* (5S-23S) y los genes *rrs* (ARNr 16S), *p93* y *fla* pero dicha clasificación no coincide con

características fenotípicas y biológicas como los hospederos predilectos y las manifestaciones clínicas (Dykhuizen Y Baranton, 2001).

2.3.2.1. Enfermedad de Lyme

La enfermedad de Lyme se describió por primera vez en 1975, fue descubierta por Steere y la espiroqueta se aisló y se nombró en 1982. La enfermedad de Lyme se ha convertido en la infección transmitida por artrópodos más frecuentemente diagnosticada en Estados Unidos, donde se registran más de 15, 000 casos anuales (Orloski *et al.*, 2000).

La enfermedad de Lyme cobro importancia a finales del Siglo XX, debido a la dificultad de su diagnóstico y el severo daño a la salud del hospedero afectado, además de que no es una tarea fácil prevenirla y controlarla (Heyman, *et al.*, 2010). La enfermedad de Lyme es una infección cosmopolita (Juricová y Hubálek, 2009).

Los vectores de *B. burgdorferi* sensu lato son: *I. scapularis* e *I. pacificus* en Norteamérica, *I. ricinus* en Europa y norte de África e *I. persulcatus* en Asia. (Parola y Raoult, 2001). En México se han encontrado garrapatas con *B. burgdorferi* sensu lato, además de las evidencias serológicas en pacientes con sospechas de la enfermedad. (Gordillo-Pérez *et al.*, 2003).

El cuadro de la Enfermedad de Lyme es muy variado, debido a que muchos individuos pueden ser asintomáticos. El patógeno se incuba 3 a 32 días, la enfermedad tiene varias fases (Cuadro 2.4): infección localizada, diseminada y persistente (Steere *et al.*, 2004). La EL es multisistémica y proteiforme porque no tiene un cuadro clínico específico, en contadas ocasiones es fatal (Braton *et al.*, 2008). El tratamiento de elección es Doxiciclina 100 mg dos veces al día en adultos y 2 - 4 mg/kg en niños, vía oral por 21 días (Vanousová y Hercogová, 2008).

Cuadro 2.4. Las características clínicas de la Enfermedad de Lyme.		
Infección localizada	Infección diseminada	Infección persistente
En la mordedura se genera un eritema migratorio de 5-15 cm en 70 a 80 % de los pacientes y se va aclarando del centro.	Lesiones secundarias anulares y/o múltiples eritemas migratorios en piel.	Ataques intermitentes de artritis.
Artralgias	Meningitis linfocítica aguda.	Acrodermatitis crónica atrofiante.
Mialgias	Neuropatía craneal Radiculoneuritis.	Anormalidades neurológicas: trastornos cognoscitivos insidiosos, dolor radicular espinal y/o parestesias distales.
Fiebre	Dolor en articulaciones, tendones, músculos o hueso.	
	Manifestaciones oculares (episcleritis, queratitis, uveítis anterior, vasculitis retinal, neuritis óptica).	

(Steere *et al.*, 2004; Braton *et al.*, 2008).

El diagnóstico es difícil porque no hay un método específico y certero. Con microscopia directa en campo oscuro, hay baja eficacia por el escaso número de microorganismos presentes. En cultivo no se recomienda por la variabilidad en los cultivos, lo laborioso, caro y lento. El PCR de muestras de sangre, LCR y líquido sinovial debe ser inmediato, además de que el ADN del hospedero interfiere con la detección por PCR. La sensibilidad de la PCR es variable (10 - 83 %) dependiendo del tipo de muestra clínica y del gen amplificado, por ello no se recomienda su uso

en los laboratorios de diagnóstico, en presencia de características no se requiere ninguna prueba (Aguero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

Los anticuerpos IgM específicos tienen el mayor pico de la tercera a sexta semana de la enfermedad; los anticuerpos IgG aumentan lentamente después de semanas o meses de infección, llegando a sus títulos máximos durante la etapa de artritis. Entre los métodos más utilizados para la detección de anticuerpos se encuentran la inmunofluorescencia indirecta (IFI). La IFI emplea como antígeno células enteras de las borrelias y permite la detección de IgM e IgG. Las principales limitaciones para su uso son la necesidad de empleo de un microscopio de fluorescencia, personal bien entrenado, la subjetividad en la lectura e interpretación y la baja especificidad, porque se presentan con frecuencia reacciones cruzadas con anticuerpos contra otros patógenos (Wilske, 2005).

2.3.3. *Ehrlichia canis*.

Ehrlichia canis que es una alfa protobacteria intracelular obligada. Este agente etiológico es un cocobacilo Gram negativo transmitido por garrapatas duras a mamíferos, específicamente caninos y humanos. Son bacterias pequeñas, inmóviles, pleomórficas, que poseen una delgada y rizada membrana externa, separada de la membrana citoplasmática por el espacio periplásmico. Cada célula bacteriana consiste en un solo cromosoma circular (Harris *et al.*, 2010).

Por medio del microscopio electrónico se han observado morfologías celulares cocoides (denso-espinal) y cocobacilares (reticulada), los primeros son más pequeños, midiendo de 0,4 a 0.6 μm de diámetro, las células reticuladas por su parte miden de .7 a 1.9 micras (Nahed *et al.*, 2010; Nicholson *et al.*, 2010).

Los análisis genéticos de los genes de ARNr 16S, de choque térmico y de genes de proteínas de superficie han reclasificado los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Cowdria*, *Neorickettsia* y *Wolbachia*. Como resultado de estas investigaciones el género *Ehrlichia* está ahora conformado por *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* y *E. ruminatum* (Ettinger, 2007).

2.3.3.1. Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC).

Las ehrlichiosis son enfermedades que afectan a los vertebrados y se transmiten por medio de un vector y generadas por bacterias Gram negativas intracelulares estrictos, que forman una mórula (Rikihisa, 1991; Cohn, 2003). Inicialmente era una total confusión el origen etiológico de la EMC y fue nombrada de diferentes maneras: Rickettsiosis canina, Fiebre hemorrágica canina, Enfermedad del perro rastreador, Tifus de la garrapata canina, Desorden hemorrágico de Nairobi y Pancitopenia tropical canina. Dichos nombre surgen como aseveración de distintos aspectos de la misma enfermedad (Waner y Harrus, 2000).

Finalmente el agente causal de la Ehrlichiosis Monocítica Canina EMC se encontró por primera vez en 1935 en el instituto Pasteur de Argelia, tal microorganismo es conocido actualmente como *E. canis* y fue identificado por Donatien y Lestoquard que lo diferenciaron de *R. conorii* (la cual afecta al humano), nombrándolo *R. canis moshcovskii* (Donatien y Lestoquard, 1935; Huxsoll *et al.*, 1969). Dichos investigadores observaron que un grupo de caninos infestados con garrapatas presentaban un proceso febril agudo acompañado de anemia, por lo que al analizar los monocitos de estos perros observaron pequeños microorganismos. En 1945 se renombro como *E. canis* en honor al bacteriólogo Paul Ehrlich (Ascaso, 2001). En un inicio *E. canis* se relacionaba con un cuadro benigno que solo era patológico en cachorros, pero en los inicios de los años 70's tras la aparición de brotes epizooticos en perros de las fuerzas armadas y su posterior cultivo, fue que se le señalo como el agente que generaba la pancitopenia tropical canina (Sainz, 1996; Harris *et al.*, 2010). Al final de los ochentas se identificó *E. canis* en humanos, lo que aumento el interés en el patógenos aunque después se aclaró que era *E. chaffeensis* (Ewing *et al.*, 1987).

En 1986 que dicho agente fue detectado en Estados Unidos, aunado a una enfermedad humana, incrementando con esto el interés para seguir investigando tal organismo, y por ende a todas las enfermedades causadas por organismos del género Ehrlichia (Ascaso, 2001; Neer y Harrus, 2006). En 2006 un estudio logro aislar dicho agente en humanos (Nicholson *et al.*, 2010).

La densidad alta de vectores como *Amblyomma* y *R. sanguineus* (la garrapata marrón del perro) incrementa la distribución demográfica de las ehrlichiosis (Nahed *et al.*, 2010; Nicholson *et al.*, 2010). El principal vector de *Ehrlichia canis* es *Rhipicephalus sanguineus* también conocida como la garrapata marrón del perro, la cual se encuentra en todo el mundo ya que el humano la ha diseminado en sus migraciones constantes. Su hospedero predilecto es el perro, pero también parasita otros vertebrados, además los pequeños mamíferos silvestres le funcionan como hospederos reservorio (Fisher, 2006).

Existe una enorme variación en los signos clínicos debido a factores como: diferencias en la patogenicidad entre las cepas, infecciones concomitantes con otras enfermedades transmitidas por garrapatas y el estado inmunitario del hospedero. Suele atacar todas las razas pero el Ovejero Alemán parece ser el más predispuesto a desarrollar ehrlichiosis (Warner y Harrus, 2000).

La ehrlichiosis monocítica canina tiene tres fases: aguda, subclínica y crónica, siendo la etapa crónica la que presenta mayor severidad de los signos clínicos. La fase crónica se manifiesta con: trombocitopenia severa (palidez, petequias, equimosis y epistaxis), proteinuria (nefropatía por pérdida de proteínas que genera glomerulonefritis al depositarse inmunocomplejos en los capilares glomerulares) edemas (disnea, hepatomegalia, esplenomegalia o linfadenopatía), hipertensión sistémica (uveítis) y meningoencefalitis (convulsión). El tratamiento de elección para infecciones por *Ehrlichia canis* incluye β -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, lincosamidas, fluoroquinolonas y tetraciclinas, aunque la Doxiciclina es la más utilizada para éste fin, en la misma dosis indicada para tratar la EGH (Pasquale y Tan, 2005; Tauber y Nau, 2008).

2.3.4. *Rickettsia rickettsii*

Las Rickettsias son microorganismos que comparten características tanto de bacterias como de virus, transmitidas por mordedura de garrapatas. *Rickettsia rickettsii* es un cocobacilo inmóvil gramnegativo, intracelular obligado. Suele vivir

en las células endoteliales o en los macrófagos, se encuentran libres en el citosol o bien en el núcleo según su especie (Valbuena *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2004). Poseen un genoma pequeño y un cromosoma circular y en la actualidad están incluidas en el grupo de alfa proteobacterias (Parola, *et al.*, 2005; Raoult, 2005).

Hasta el momento la taxonomía no se encuentra totalmente establecida y hasta que se logre secuenciar el genoma completo de las distintas especies será imposible llegar a una clasificación verdaderamente adecuada. Las especies del género *Rickettsia* según una clasificación se dividen en dos grupos: el primero es el grupo tifus, que se conforma por *R. typhi*, *R. prowazekii* y *R. cánada*; el segundo grupo es el de las fiebres manchadas, que se encuentra constituido por más de 20 especies; anteriormente existía un tercer grupo que ahora se conoce como género *Orientia* (Sekeyova *et al.*, 2001; Raoult, 2005).

Otra clasificación de las rickettsias las divide en cinco grupos, los cuales se generaron en base al análisis de los genes codificantes de la citrato sintasa, del antígeno de 17kDa, de las proteínas de superficie externa rOmpA y rOmpB, y de la proteína PS120 (gen D), ya que el gen ARNr 16S es casi idéntico en todas las especies (Sekeyova *et al.*, 2001; Raoult, 2005). Los cinco grupos mencionados son los siguientes.

- I. Grupo *Rickettsia massiliae*: *R. massiliae*, Bar 29, *R. rhipicephali* y *R. aeschlimanii*.
- II. Grupo *Rickettsia rickettsii*: *R. sibirica*, *R. mongolotimonae*, *R. parkeri*, strain S, *R. africae*, complejo *R. conorii* (cepas M1, Moroccan, Malish, Indian y Kenya tick typhus rickettsias, M-1, Seven strains, Astrakhan fever rickettsia, Israeli tick typhus), Thai tick typhus rickettsias, *R. slovacae*, *R. honei*, *R. rickettsii*, *R. japonica* y *R. montanensis*.
- III. Grupo *Rickettsia helvetica*: sólo con *R. helvetica*.
- IV. Grupo *Rickettsia akari*: *R. australis*, *R. akari* y agente ELB (*R. felis*).
- V. Grupo tifus: *R. prowazekii* y *R. typhi*.

Las rickettsias se asocian muy estrechamente con artrópodos hematófagos obligados, debido a que existe una co-evolución entre ambos organismos. Los artrópodos hematófagos funcionan como reservorios y vectores de las rickettsias. Estas últimas infectan la mayoría de los órganos de las garrapatas, haciendo posible la transmisión transovárica y por tanto transestadialmente. Las rickettsias en las garrapatas infectan la mayoría de los órganos y pueden ser transmitidas de manera transovárica (no todos los huevos se infectan, pero aún no se sabe cuáles son los factores determinantes) y trans-estádial (100%). La infección de las garrapatas ocurre de forma congénita, por vía sexual (durante la cópula), por medio de la alimentación (alimentándose de un animal infectado, o por alimentarse inmediatamente en el mismo sitio aunque el animal no éste infectado). Una vez infectadas, las garrapatas mantienen la infección de por vida. Hasta la fecha es desconocida la manera en que las rickettsias evaden el sistema de defensa de las garrapatas, para llegar sin problemas a los ovarios y/o a la hemolinfa y ser inoculados al hospedero (Wang y Nuttall, 1999; Labruna, *et al.*, 2009).

2.3.4.1. La Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR).

Las rickettsiosis son enfermedades infecciosas producidas por los microorganismos del género rickettsia. Han cobrado mucha importancia debido al incremento de su incidencia y distribución. (Parola *et al.*, 2008). Han logrado llamar la atención a nivel mundial debido a diversos motivos, en Brasil y Perú debido a la reemergencia que la caracteriza para esas zonas geográficas, en Colombia debido a brotes letales con casos de desenlace fatal, en EUA por su endemismo, y además de lo anterior, el aumento de los casos en humanos aunado al potencial que dichas bacterias tienen para ser utilizadas como armas de bioterrorismo. Según el Centers for Disease Control and Prevention. En EUA., anualmente se reportan de 25 a 1200 casos anuales, en México a pesar de que desde 1940 se tienen reportes de la enfermedad de la FMMR, los casos reportados son muy bajos y hasta el 2002 solo se han dado a conocer 3 muertes por esta enfermedad, según la secretaria de salud dichos casos ocurrieron en Coahuila y Durango (Labruna, *et al.*, 2009; Hidalgo, *et al.*, 2011).

La FMMR resulta especialmente importante debido a la mortalidad más que a la morbilidad de la misma, ya que en EUA es la enfermedad transmitida por garrapatas que mayor mortandad genera (Feng *et al.*, 2004). La enfermedad conocida como Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR) es una enfermedad infecciosa aguda, de tipo zoonótico que puede desencadenar en la muerte, causada por la bacteria *Rickettsia rickettsii*, la cual es transmitida por garrapatas de los géneros *Amblyomma*, *Dermacentor* y *Rhipicephalus*. En 1906 Howard Taylor Ricketts se percató de que el vector de *Rickettsia rickettsii* era la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* y para 1909 la dio a conocer como el patógeno causante de la FMMR (Labruna, *et al.*, 2009). El cuadro clínico que genera *Rickettsia rickettsii* consiste en: Cuadro febril, cefalea, mialgias, estupor, somnolencia, delirio, cuadro exantemático. El tratamiento es Doxiciclina vía oral a la dosis que se usa para *Ehrlichia canis* (Rathore, 2010).

2.4.1. Técnicas diagnósticas

Para controlar las enfermedades infecciosas es necesario echar mano de métodos diagnósticos específicos que permitan la elección y aplicación del tratamiento adecuado. Es común que los patógenos expresen una gran variabilidad genética, siendo de vital importancia el uso de pruebas de diagnóstico con alta especificidad para discernir entre la gran variabilidad. Los métodos diagnósticos rutinarios tienen su base en la detección del organismo infectante por observación del mismo, o en características fenotípicas específicas como la valoración de varias isoenzimas y/o reacciones de tipo inmunológico. Aunque en muchas ocasiones la sensibilidad de los métodos mencionados es reducida, a continuación se mencionan brevemente los más relevantes (Mendoza, 2010).

- **Cultivo.** Método que debe realizarse en un laboratorio con nivel de seguridad tipo 3. Para el cultivo de *A. phagocytophilum* se usa una línea celular de células promilocíticas leucémicas HL-60. Se inocula sangre (100 µL), o suero sanguíneo en EDTA en frascos de 25 cm² con células HL-60. La infección

se comprueba 3-7 días después de la inoculación por tinción Giemsa, por serología o PCR (Mendoza, 2010).

- **Serología:** Técnica de laboratorio más usada para el diagnóstico microbiológico de estas infecciones y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) es la más común, se utilizan sustrato de células infectadas o antígenos puros. Aunque no es muy sensible en fases agudas y hay reacción cruzada entre especies de *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *R. rickettsii*. Su limitación es la falta de sensibilidad en fases agudas (Mendoza, 2010).

- **Detección molecular.**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en la amplificación de ácido desoxirribonucleico (DNA) o ácido ribonucleico (RNA) y es una de las pruebas diagnósticas de mayor importancia y valor en la medicina clínica. La importancia del PCR radica en que por medio de tal prueba se obtienen más de diez copias de secuencia blanco cuando se usa DNA purificado, siendo posible detectarlos en fentogramos ($fg = 10^{-15}$ g). Por otra parte el PCR tiene desventajas que limitan su practicidad de aplicación, tales como el elevado costo del equipo (termociclador) y lo laborioso de su metodología, razón por la cual es complicado que se pueda implementar como una técnica diagnóstica de rutina (Mendoza, 2010).

En recientes fechas surgió una variante del PCR que se conoce como Amplificación Isotérmica Mediada por Lazo (LAMP) (Notomi *et al.*, 2000). Permite la amplificación altamente eficiente por una sola enzima a una temperatura constante, ofreciendo alta especificidad, rapidez y sencillez de detección. Con alta sensibilidad, por lo que es posible la discriminación visual del resultado sin equipos sofisticados (Tomita *et al.*, 2008).

2.4.2. Inmunofluorescencia.

En 1942 se dio a conocer la técnica de inmunofluorescencia por Coons que un año antes conjugó anticuerpos con colorantes fluorescentes. Es una técnica inmunohistoquímica que conjuga colorantes fluorescentes (isotiocianato de fluoresceína, rodamina B de lisamina o ácido 1-dimetilaminonaftalen-5-sulfónico) con anticuerpos y/o antígenos, para posteriormente exponer este conjugado a los anticuerpos o antígenos correspondientes. Al observar con luz ultravioleta (UV) las reacciones positivas se ven fluorescentes en el microscopio de inmunofluorescencia. Existen dos variables (Cuadro 2.5) de ésta técnica serológica (Lynch *et al.*, 1997).

Durante la reacción el pH debe ser estable para que no se afecte la fluorescencia, el fluoróforo absorbe la luz en bajas longitudes de onda, excitando los electrones hasta emitir una segunda longitud de onda. El isotiocianato de fluoresceína colorea verde manzana bajo la luz ultravioleta. Existen dos variables de la técnica (Cuadro 2.5) aunque la IFI (Figura 2.6.) es más utilizada debido a los beneficios que ofrece a pesar de sus desventajas (Cuadro 2.6) (Lynch, *et al.*, 1997).

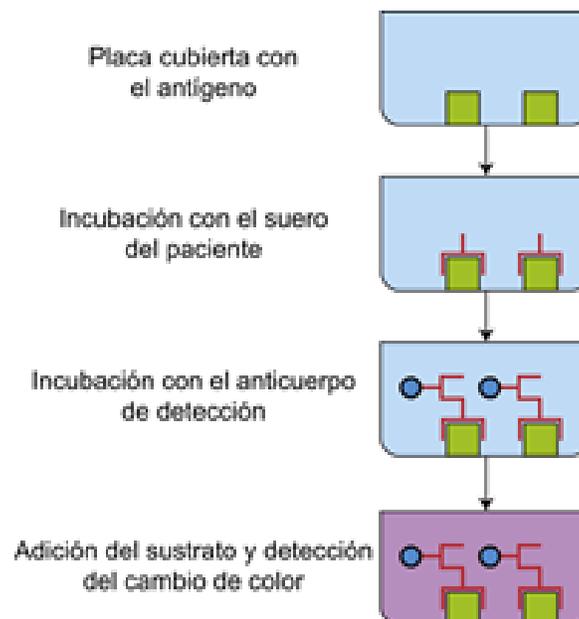


Figura 2.6. Reacción de IFI (Hernández y Cabiedes, 2010).

Cuadro 2.5. Tipos de Inmunofluorescencias.	
DIRECTA	INDIRECTA
<p>Demuestra presencia de antígeno mediante reacción directa con un anticuerpo específico marcado con colorante fluorescente.</p> <p>El anticuerpo se obtiene al inocular el microorganismo productor del antígeno en un animal.</p>	<p>Técnica de doble capa: se aplica el anticuerpo sin marcar sobre un portaobjetos que contiene el sustrato y se agrega una anti-inmunoglobulina conjugada con fluorocromo.</p> <p>La inmunofluorescencia es más brillante que la directa porque varias Anti-inmunoglobulinas se unen a las moléculas Antígeno-anticuerpo y en menos tiempo, ya que sólo se necesita la anti-inmunoglobulina marcada.</p>

(Lynch, *et al.*, 1997).

Cuadro 2.6. Ventajas y desventajas de IF.	
Ventajas	Desventajas
<p>Resultados rápidos ya que no requiere cultivos.</p> <p>Además es una técnica sensible y permite identificar microorganismos específicos, incluso muertos.</p>	<p>Costos de reactivos, equipo y personal especializado.</p> <p>Posee poca especificidad y puede haber reacciones cruzadas.</p>

(Lynch, *et al.*, 1997).

2.3.2.1. Anti-inmunoglobulinas

Para obtener los anticuerpos secundarios se mezclan sueros de una especie animal y se precipitan las globulinas (anticuerpo), que se inoculan a un organismo de distinta especie para que produzca anti-globulinas que se marcan con un fluorocromo. Este anticuerpo marcado se une al anticuerpo no marcado

dando reacción positiva de fluorescencia solo en presencia del complejo Antígeno-anticuerpo (Rojas, 1995).

2.3.2.2. Fluorocromos

Son sustancias que emiten un fotón cuando son excitados por un fotón incidente. Estos colorantes se unen a las proteínas sin afectar los grupos de combinación específica del anticuerpo. La reacción de unión se lleva a cabo entre los grupos amino y carboxilo de la proteína y los grupos tiocianato o cloruro de sulfonilo de los colorantes. La fijación disminuye la fluorescencia de los fluorocromos, ya que los conjugados solo muestran de 15 - 30 % de la fluorescencia del colorante libre (Abul, 1995).

3. JUSTIFICACIÓN

El contacto contante del humano con los animales domésticos y silvestres, cada vez se vuelve más estrecho debido a la explosión demográfica, misma que ha generado que se ocupen nuevos espacios. Por otra parte el cambio climático y la fácil adaptación de los artrópodos vectores de enfermedades zoonóticas, ha generado el incremento de infecciones causadas por bacterias intracelulares como: *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi*, *E. canis* y *R. rickettsii*. Las cuales son transmitidas a los vertebrados (incluyendo el humano) por medio de la mordedura de garrapatas infectadas, provocando en el hospedero enfermedades de difícil diagnóstico debido a sus inusuales manifestaciones clínicas y altas probabilidades de coinfecciones debido a que una garrapata puede transmitir más de un patógeno al hospedero en turno (Krauss *et al.*, 2003; Álvarez y Bonilla 2007);

Actualmente se ha puesto atención a tales enfermedades debido a que se aumentaron en los casos diagnosticados a nivel mundial, aún a pesar de que las técnicas actuales más precisas no están disponibles en las principales zonas endémicas. Lo que nos sugiere que existen muchos pacientes sin un diagnóstico adecuado. Además algunos de estos microorganismos pueden causar la muerte en caso de no tratarse a tiempo. Los roedores silvestres cumplen el papel de

hospedero reservorio de estas enfermedades y por su cercanía a los humanos tiene mayor trascendencia aún (Pérez-Osorio *et al.*, 2008)

De manera que la presente investigación analizara por medio de IFI varios sueros de roedores silvestres capturados en los alrededores de unidades de producción animal con alta incidencia de garrapatas. Con el fin de saber si alguno de los patógenos mencionados está establecido entre la población de roedores silvestres, ya que de ser así representaría un grave riesgo para los individuos susceptibles que habitan ahí.

4. HIPÓTESIS

Existen anticuerpos contra *Anaplasma Phagocytophilum*, *Borrelia Burgdorferi*, *Ehrlichia Canis*, y *Rickettsia Rickettsii* en suero sanguíneo de roedores silvestres de la Sierra de Querétaro.

5. OBJETIVO GENERAL

Detectar mediante inmunofluorescencia indirecta la presencia de anticuerpos contra *Anaplasma Phagocytophilum*, *Borrelia Burgdorferi*, *Ehrlichia Canis*, y *Rickettsia Rickettsii* en el suero sanguíneo de roedores silvestres de la sierra de Querétaro.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

Estandarizar la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta para la detección de anticuerpos contra *Anaplasma Phagocytophilum*, *Borrelia Burgdorferi*, *Ehrlichia Canis*, y *Rickettsia Rickettsii* en suero sanguíneo de roedores silvestres.

Determinar la presencia de anticuerpos contra *Anaplasma Phagocytophilum*, *Borrelia Burgdorferi*, *Ehrlichia Canis*, y *Rickettsia Rickettsii* en roedores silvestres de la Sierra de Querétaro.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Área de estudio.

La presente investigación se realizó en roedores silvestres capturados en las localidades del Lindero y Purísima de Arista, ubicadas en Jalpan de Serra; donde existen reportes de estudios anteriores que hacen referencia a una alta población de garrapatas en las unidades de producción. El municipio de Jalpan de Serra se encuentra (Figura 7.1.) entre los paralelos $21^{\circ} 30' 48.41''$ de latitud norte y los meridianos $99^{\circ} 10' 18.74''$ de longitud oeste; tiene una altitud que va hasta los 1195 msnm; colinda al norte y este con San Luis Potosí, al sur con el municipio de Landa de Matamoros, San Joaquín, Pinal de Amoles y el estado de Hidalgo, y al oeste con el municipio de Pinal de Amoles, Arroyo Seco y el estado de San Luis Potosí. Presenta un clima semicálido subhúmedo con lluvias en verano. La vegetación representativa correspondiente a bosque (42.8%), selva baja (37.1%), matorral (8.3%) (INEGI, 2015).

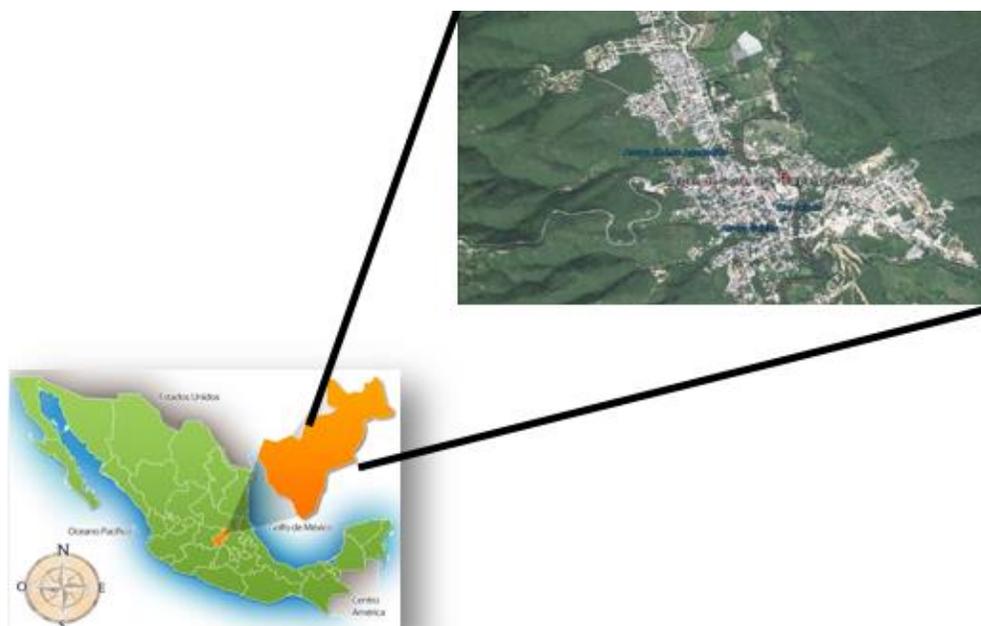


Figura 7.1. Ubicación geográfica del municipio de Jalpan de Serra (INEGI 2015).

Debido a que la población real actual de la mastofauna se desconocía, fue necesario revisar los registros de abundancia relativa de mamíferos con respecto de la vegetación (bosques mesófilos, bosque encinos y bosque pinos), para determinar el tamaño de muestra de los roedores silvestres a capturar para la investigación, Determinándose en los siguientes valores: *Peromyscus* (20.1 – 57.5 individuos / km²), *Reithrodontomys* (6 – 30 individuos / km²) y *Lyomis* (8.33 individuos / km²). Cada lugar de colecta posee 20 km² por lo que la abundancia de roedores calculada ronda entre los 40 – 1200 individuos totales, admitiendo que son viables las variaciones en función del género, llegando a la determinación de que solo se capturaría el 10% de los roedores calculados (Linzey *et al.*, 2008).

La captura de los animales silvestres fue cerca de las unidades de producción con reporte de alta población de garrapatas y con el permiso de colecta FAUT-0043 expedido por la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

7.2. Colecta de roedores.

Se capturaron 92 roedores en las comunidades Purísima de Arista y El Lindero, pertenecientes al municipio de Jalpan de Serra. Los roedores fueron colectados mediante la técnica de contención física, utilizando trampas tipo Sherman folding-style live trap (3 x 3.75 x 12") cebadas con una mezcla de avena, crema de cacahuate y vainilla (Gallina y López-González, 2011). Una vez capturados los sujetos de estudio, se aplicó contención química con fármacos (Isoflorano) como método de sedación, por inmersión colocando al individuo en una cámara hermética con un algodón que contenía anestésico (American Veterinary Medical Association, 2013). Para realizar la toma de las muestras biológicas (sangre), dicho procedimiento se realizó sin ruidos y movimientos excesivos, cubriendo los ojos con un trapo para evitar el estrés y reducir el daño de la luz del sol debido a la posible incapacidad de reacción de los músculos del iris causada por ciertos fármacos (Montané *et al.*, 2003).

Debido a que los roedores eran pequeños y la cantidad de sangre necesaria para el muestreo es casi igual a la cantidad circulante en estos individuos, fue necesario realizarles posterior a la anestesia, la eutanasia por exanguinación cortando los principales vasos sanguíneos del cuello con una navaja de bisturí, y conservando las cabezas de los individuos para la posterior identificación de la especie muestreada (American Veterinary Medical Association AVMA, 2013; Comité Asesor Bioética FONDECYT – CONICYT 2009; Sikes *et al.*, 2011).

7.3. Procesamiento de las muestras seleccionadas

Las muestras sanguíneas obtenidas se transportaron al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ, en donde se almacenaron a -70°C para su posterior análisis.

Los residuos biológicos-infecciosos se manejaron de acuerdo a lo establecido por la NOM-087-ECO-SSA1-2002. Es decir, las agujas utilizadas fueron separadas en un recipiente de punzocortantes (color rojo), en el caso de órganos y vísceras estas se depositaron en bolsas amarillas con cal, el resto de la sangre se inactivó con hipoclorito de sodio al 6% y se desechó en un recipiente hermético rojo. Ambos recipientes se incineraron, tales procedimientos se fueron realizados por una empresa especializada contratada por la Facultad de Ciencias Naturales.

7.4. Análisis por Inmunofluorescencia Indirecta de los sueros problema.

Los sueros sanguíneos de los roedores capturados fueron analizados mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos circulantes contra *Anaplasma Phagocytophilum*, *Borrelia Burgdorferi*, *Ehrlichia Canis* y *Rickettsia Rickettsii*. Se utilizaron kits comerciales de la marca VMRD laminillas con los antígenos fijados, así como control positivo y control negativo de la marca Vmrd para la detección de anticuerpos presentes en el suero de los roedores silvestres.

Cuadro 7.1. Reactivos para Inmunofluorescencia Indirecta (Vmrđ).		
Agente infeccioso	Tipo de producto y tamaño	Catalogo
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Laminilla de 12 pozos con <i>A. phagocytophilum</i>	SLD-IFA-AP
	Control positivo 1ml (Equino).	PC-IFA-AP
	Control negativo 1ml (Equino).	NC-IFA-AP
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Laminilla de 12 pozos con <i>B. burgdorferi</i>	SLD-IFA-LD
	Control positivo 1ml (Canino).	PC-IFA-LD
	Control negativo 1ml (Canino).	NC-IFA-LD
<i>Ehrlichia canis</i>	Laminilla de 12 pozos con <i>E. canis</i>	SLD-IFA-EC
	Control positivo 1ml (Canino).	PC-IFA-EC
	Control negativo 1ml (Canino).	NC-IFA-EC
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Laminilla de 12 pozos con <i>R. rickettsii</i>	SLD-IFA-RMSF
	Control positivo 1ml (Canino).	PC-IFA-RMSF
	Control negativo 1ml (Canino).	NC-IFA-RMSF

Para el marcaje se utilizó la Proteína G recombinante Alexa Fluor 488 ® que funciona perfecto para la unión covalente de un fluoróforo a diminutas cantidades de anticuerpos IgG (~ 10-20 µg), sin problemas por proteínas contaminantes y/o estabilizadores como BSA, por lo que sin implementar columnas se obtienen resultados más brillantes y evidentes, ya que cuando se marcaba el anticuerpo primario con el fluoróforo, la fluorescencia obtenida era más baja y menos específica. Es posible marcar distintos anticuerpos primarios del mismo isotipo o misma especie en el mismo experimento, usando diferentes fluoróforos. Además tiene alta eficiencia de unión (Cuadro 7.2.) para IgG1 de ratón y rata, que suelen tener una escasa especificidad de unión con la proteína A. La proteína G

Alexa Fluor 488 con peroxidasa de rábano (HRP) es una proteína bacteriana que posee alta afinidad de unión a tres sitios Fc de distintas clases y las subclases de las inmuno-globulinas de gran un número de especies y en solo 15 minutos por medio de la excitación/emisión (495/519 nm) emite fluorescencia verde brillante en sueros positivos (Thermofisher, 2015).

Cuadro 7.2. Eficiencias de unión de la Proteína A y la Proteína G.		
Anticuerpo	Proteína A	Proteína G
Bovino	+	++
Canino	++	+
Caprino	+	++
Felino	++	-
Lagomorfos	++	++
Ovinos	-	++
Humano IgG (1,2,4)	++	++
Humano IgG 3	-	++
Porcino	++	++
Rata	-	+
Ratón IgG1	-	++
Ratón (Otros).	++	++

(Molecular Probes, 2005).

El proceso completo de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta se tuvo que estandarizar con el fin de identificar cuál sería el protocolo a seguir que nos ofrecía mejor apreciación de los resultados y se describe a detalle en el Anexo 1.

8. RESULTADOS

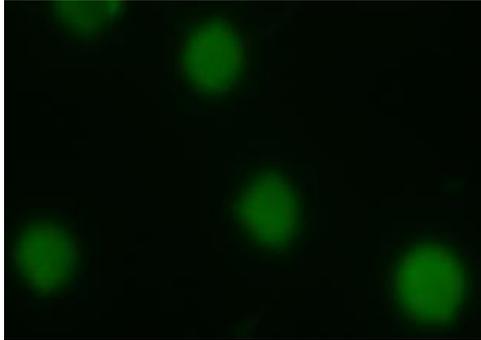
Se capturaron 92 roedores en las comunidades de El Lindero y Purísima de Arista, ubicadas en el municipio de Jalpan de Serra, Querétaro. Los roedores pertenecen a las especies *Rattus rattus* y *Peromyscus mexicanus*.

Los resultados obtenidos de las inmunofluorescencias indirectas (Cuadro 8.1) arrojaron un 100 % de positividad para anticuerpos contra *Anaplasma phagocytophilum* y *Ehrlichia canis*, y 100 % de negatividad para los anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* y *Rickettsia rickettsii*. Las imágenes resultantes de la IFI se pueden observar de la 1 a la 92 en el Anexo 2 del presente trabajo y algunas imágenes de las mismas se presentan a continuación.

Cuadro 8.1. Resultados de IFI en sueros de roedores silvestres.		
Agente	Positivos	Negativos
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	92	0
<i>Borrelia burgdorferi</i>	0	92
<i>Ehrlichia canis</i>	92	0
<i>Rickettsia rickettsii</i>	0	92

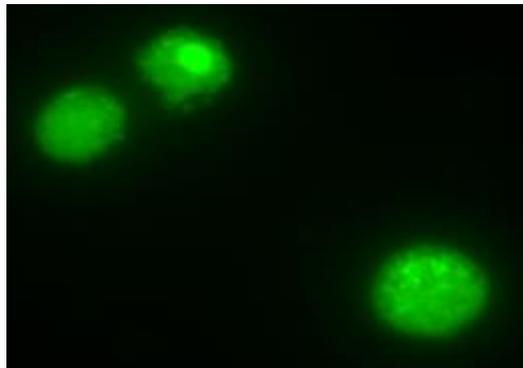
Resultados de IFI para *Anaplasma phagocytophilum*.

Figura 8.1. Control Negativo *A. phagocytophilum*.



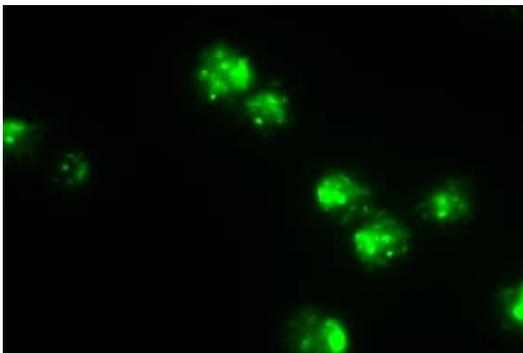
Vista 100X (Lara, 2015).

Figura 8.2. Control Positivo *A. phagocytophilum*.

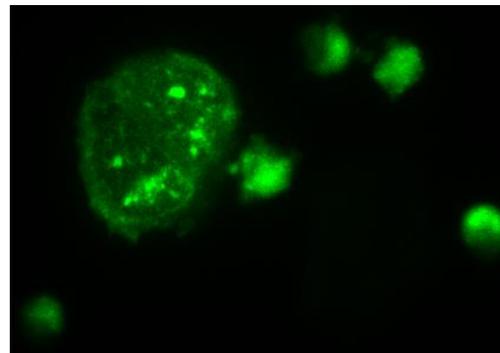


Vista 100X (Lara, 2015).

Figura 8.3. Sueros analizados por IFI para *A. phagocytophilum*



Suero 19. Vista 100X (Lara, 2015).



Suero 52. Vista 100X (Lara, 2015).

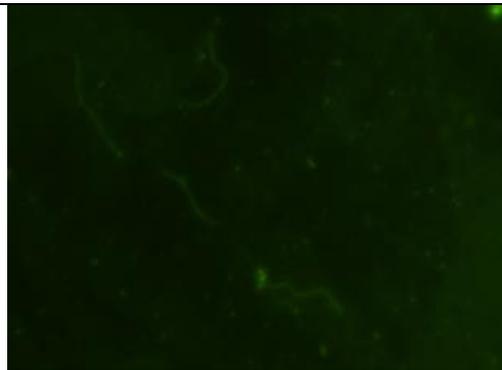
Resultados de IFI para *Borrelia burgdorferi*.

Figura 8.4. Control Negativo *B. Burgdorferi*.



Vista 100X (Lara, 2015).

Figura 8.5. Control Positivo *B. burgdorferi*.



Vista 100X (Lara, 2015).

Imagen 8.6. Sueros analizados por IFI para *B. burgdorferi*.



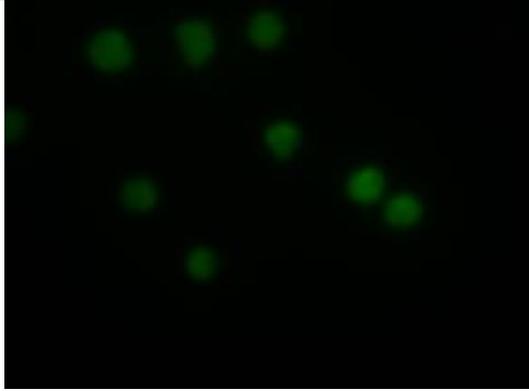
Suero 20. Vista 100X (Lara, 2015).



Suero 80. Vista 100X (Lara, 2015).

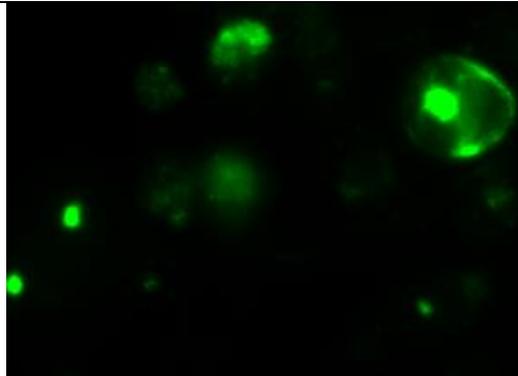
Resultados de IFI para *Ehrlichia canis*.

Figura 8.7. Control Negativo *Ehrlichia canis*.



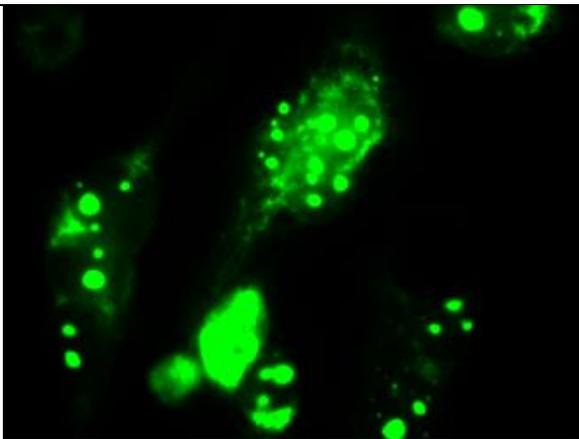
Vista 100X (Lara, 2015).

Figura 8.8. Control Positivo *Ehrlichia canis*.

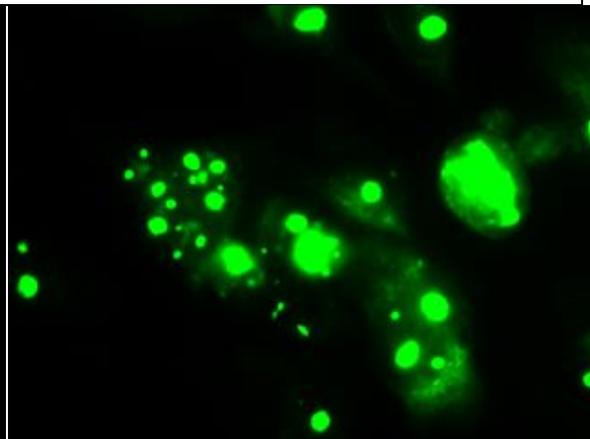


Vista 100X (Lara, 2015).

Figura 8.9. Sueros analizados por IFI para *Ehrlichia canis*.

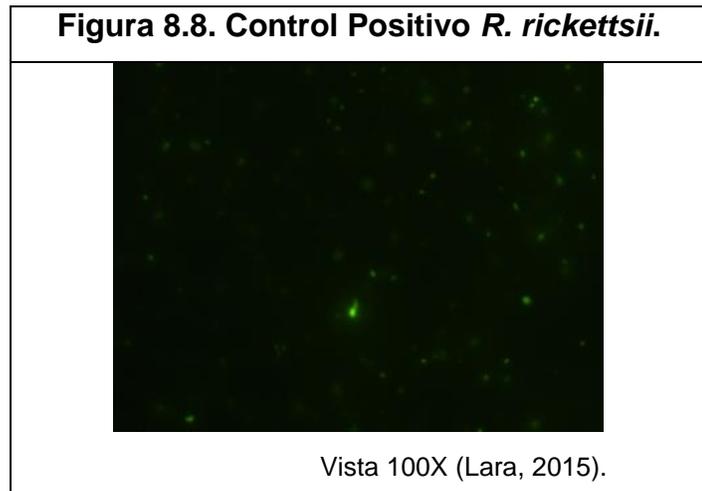
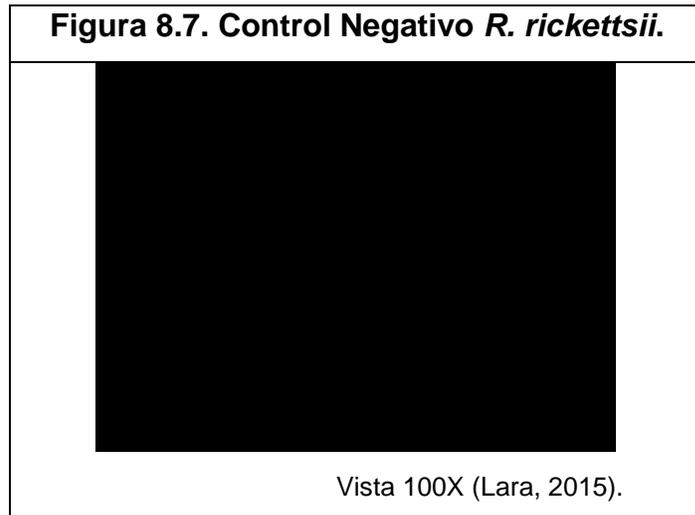


Suero 6. Vista 100X (Lara, 2015).



Suero 92. Vista 100X (Lara, 2015).

Resultados de Inmunofluorescencia Indirecta para *Rickettsia rickettsii*.



9. DISCUSIÓN

Las enfermedades transmitidas por garrapatas en la actualidad han tomado un repunte en la importancia que el sector salud pone en ellas interés particular debido al incremento en los casos diagnósticados, las amplias distribuciones de las garrapatas vectores hace posible que dichas enfermedades se sigan expandiendo a nivel mundial, generando que sea de vital importancia conocer más al respecto de la presencia de ellas en México y por supuesto en Querétaro. Es por ello que la presente tesis analizó por la técnica IFI la presencia de anticuerpos contra *Anaplasma Phagocitophylum*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* y *Rickettsia rickettsii* en suero sanguíneo de roedores silvestres capturados en Jalpan de Serra, éste es el primer estudio que se realiza en los animales reservorios de dicha localidad, por lo que los resultados obtenidos son muy interesantes y los discutiremos a continuación.

Comenzaremos con la Enfermedad de Lyme, la cual en la actualidad es considerada la zoonosis transmitida por garrapata de mayor importancia en EUA y Europa, ya que los casos diagnósticados se han incrementado a nivel mundial. En México los vectores se encuentran en costas del golfo y en las del oceano pacífico desde los años sesentas (Hoffman *et al.*, 1965) aunque también hay reportes más actuales que demuestran la presencia tanto de vectores (*Rhipicephalus sanguineus* y *Amblyomma cajennense*) como de reservorios en el Noreste de México (Gordillo, 2009) así como seroprevalencia confirmada en población Mexicana de la Ciudad de México, demostrando que el ciclo enzoótico de dicha enfermedad esta ocurriendo en distintas zonas de nuestro país (Gordillo, 2007).

Por su parte las rickettsiosis son enfermedades infecciosas producidas por los microorganismos del género *Rickettsia*. Han cobrado mucha importancia debido al incremento de su incidencia, y a la extensión de sus áreas geográficas de distribución. (Parola *et al.*, 2008). La Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR) es una enfermedad infecciosa aguda, de tipo zoonótico que puede desencadenar en la muerte, causada por la bacteria *R. rickettsii*, la cual es transmitida por garrapatas de los géneros *Amblyomma*, *Dermacentor* y

Rhipicephalus. En 1906 Howard Taylor Ricketts se percató de que el vector de *R. rickettsii* era la garrapata *R. sanguineus* y para 1909 la dio a conocer como el patógeno causante de la FMMR (Feigin, 1992). Con base en lo anterior fue que se decidió analizar los sueros de roedores silvestres en busca de anticuerpos contra los dos patógenos antes mencionados pero 92 de los 92 sueros analizados resultaron negativos, por lo que hasta el momento se puede decir que en Jalpan de Serra Querétaro no hay *B. Burgdorferi* ni *Rickettsia rickettsii*. Aunque se debe seguir investigando al respecto en distintas zonas de muestreo, con pruebas de mayor especificidad como el PCR o el método LAMP, para descartar con total certeza la presencia de los patógenos mencionados.

Por su parte *Ehrlichia canis* se transmite principalmente por la garrapata marrón (*Rhipicephalus sanguineus*) y *Anaplasma Phagocytophilum* por garrapatas de la familia Ixodidae, entre las cuales destacan por su importancia: *Ixodes scapularis*, *Ixodes pacificus*, *Dermacentor variabilis* (Rymaszewska y Grenda, 2008). En *Ehrlichia canis* la transmisión transovárica se ha corroborado pero es bien sabido que no todos los huevecillos infectados sobrevivirán ya que su viabilidad se puede ver mermada, sin embargo en *Anaplasma phagocytophilum* la transmisión transovárica no se ha corroborado en su totalidad. Por lo que es necesario que ambas bacterias se mantengan en hospederos reservorios, tales como los roedores silvestres, que transmitirán las bacterias por medio de los vectores ya mencionados a nuevos hospederos (Murray *et al.*, 2012). Infectando con anaplasmosis granulocítica y/o Ehrlichiosis canina a los vertebrados mamíferos, tales como: bovinos, caninos, equinos, felinos, e incluso a los humanos. Estas enfermedades son comunes en perros, aunque en animales de vida silvestre es una enfermedad rara, debido a que aunque se presentará la signología (la cual no todos los individuos desarrollan) su diagnóstico requiere de pruebas de laboratorio (Woldehiwet, 2010; Leschnik *et al.* 2012).

En la presente investigación se obtuvieron 92 sueros positivos para anticuerpos *contra Anaplasma phagocytophilum* y *Ehrlichia canis* en el suero sanguíneo de los 92 roedores muestreados, los cuales se encuentran en los

alrededores de zonas de producción animal. La presencia de anticuerpos contra dichos patógenos nos indica que dichos roedores estuvieron expuestos a dichas bacterias. Es muy recomendable realizar más estudios de laboratorio como el PCR que nos corroboró que ambos patógenos están presentes en la Sierra de Querétaro, así como también es básico investigar los vectores transmisores, ya que las ehrlichiosis son riesgo potencial que debe ser atendido para tomar medidas de prevención y con esto evitar que se pudiesen propagar dichas enfermedades.

Se documenta por primera vez la presencia de *A. phagocytophilum* y *E. canis* en roedores silvestres de la sierra de Querétaro. Este hallazgo pudiese relacionarse con la presencia de este agente *E. canis* en perros sintomáticos de Querétaro, ya que se tienen antecedentes de animales positivos y con presencia de garrapatas.

El constante incremento en el paso de animales domésticos y silvestres entre ciudades y localidades ha permitido el ingreso de diversos antígenos, tales como *A. phagocytophilum* y *E. canis*. Aunque los test serológicos sirven para diagnosticar sueros sospechosos cabe mencionar que varios están limitados por reacciones cruzadas entre especies relacionadas lo cual es muy común con *Ehrlichia*. La Identificación dichos patógenos de importancia zoonótica en roedores silvestres de zonas con antecedentes de garrapatas en la sierra de Querétaro, mediante Inmunofluorescencia Indirecta, demuestra la importancia de realizar más estudios al respecto ya que la población de animales silvestres y domésticos de la zona está en riesgo latente de contraer las enfermedades causadas por estos microorganismos. Lo anterior resulta de suma importancia debido a que dichos agentes infecciosos pueden atacar no solo a los animales sino también al humano, ya que las garrapatas vectores al estar presentes en los roedores silvestres que habitan en los perímetros de las zonas de agostadero de dos comunidades de la sierra de Querétaro, pueden lograr un contacto con los lugareños y al alimentarse de ellos terminaran cerrando el ciclo de transmisión de los ya mencionados patógenos.

Por lo que es importante realizar más investigaciones al respecto para prevenir la posible diseminación de estas importantes enfermedades zoonóticas, para lo cual es necesario implementar métodos diagnósticos eficaces para controlar este serio problema de índole emergente para la salud pública.

Con este trabajo se ha logrado demostrar que dichos agentes están establecidos en la sierra del estado de Querétaro, lo cual ocurrió por la presencia del vector en la ciudad.

10. CONCLUSIÓN

Con el presente trabajo se demostró por medio de Inmunofluorescencia Indirecta la presencia de anticuerpos contra *A. phagocytophilum* y *E. canis* en el suero de dos especies de roedores silvestres en el municipio de Jalpan de Serra Querétaro; agregando así a *Rattus rattus* y *Peromyscus mexicanus* en la lista de roedores infectados con tales patógenos en México, siendo de alta importancia debido a que fungen como hospederos reservorio.

11. ANEXOS

Anexo 1. Inmunofluorescencia Indirecta

La técnica de inmunofluorescencia se realizó de la siguiente manera:

En una laminilla que tiene fijados los antígenos de los patógenos problema, se colocó el suero sospechoso (buscando anticuerpos), la reacción positiva formó un complejo antígeno-anticuerpo (el anticuerpo no estaba marcado), y se agregó una anti-inmunoglobulina marcada, la cual se unió al anticuerpo del complejo antígeno-anticuerpo, y para observar la inmunofluorescencia en un microscopio con ondas de baja longitud de luz, en el objetivo 100X.

1.- Se Diluyeron los sueros problema en buffer de dilución (pH 7,2).

- 1:64 para *Borrelia burgdorferi* y *Rickettsia rickettsii*.
- 1:50 para *Anaplasma phagocytophilum* y *Ehrlichia canis*

Figura 11.1.1. Dilución de los sueros problema.



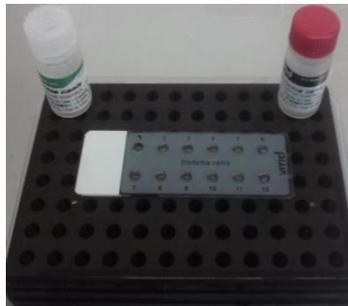
2.- Se Atemperaron las laminillas antes de sacarlas de la bolsa de papel de aluminio, colocándolas al aire de la campana de flujo.

Figura 11.1.2 Atemperación de laminillas.



3.- Se Colocaron 10 μ L de cada uno de los sueros problema anteriormente diluidos, en cada uno de los 10 pocillos asignados para este fin. Además se agregaron 10 μ L de control positivo y 10 μ L de control negativo (ambos sin diluir) en los pocillos correspondientes.

Figura 11 1.3. Sueros problema y controles.



4.- Se Incubo la laminilla en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos.

Figura 11.1.4. Incubación de laminillas.



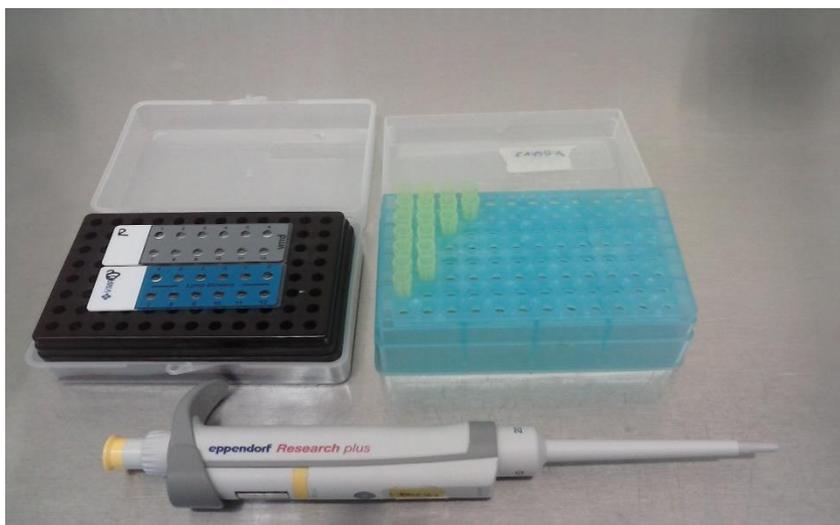
5.- Se drenaron los pocillos para luego rellenarlos por medio de una micropipeta con buffer de enjuague 1X (pH 9) y se remojaron durante 10 minutos.

Figura 11.1.5. Buffer de enjuague remojando laminilla.



6.- Se Drenó la laminilla, secando alrededor de los pozos con pulsaciones realizadas por medio de papel absorbente. Se colocaron 10 μ L del anti-IgG (Alexa Fluor 488) a una dilución de 1:20 en todos los pocillos.

Figura 11.1.6. Tinción con el Anti-IgG Alexa fluor 488.



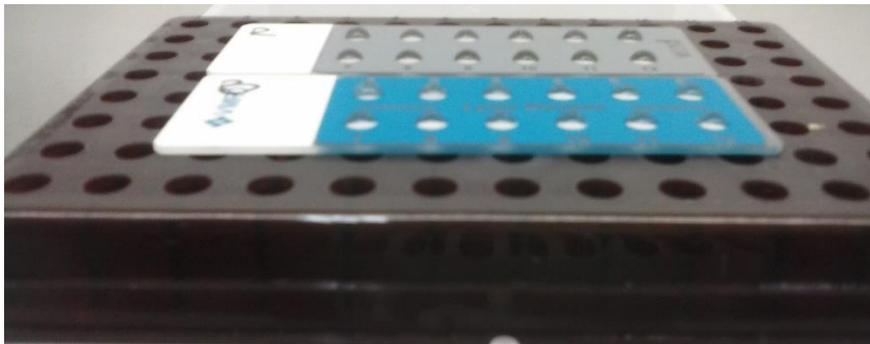
7.- Se incubo la laminilla en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos.

Figura 11.1.7. Incubación de laminilla.



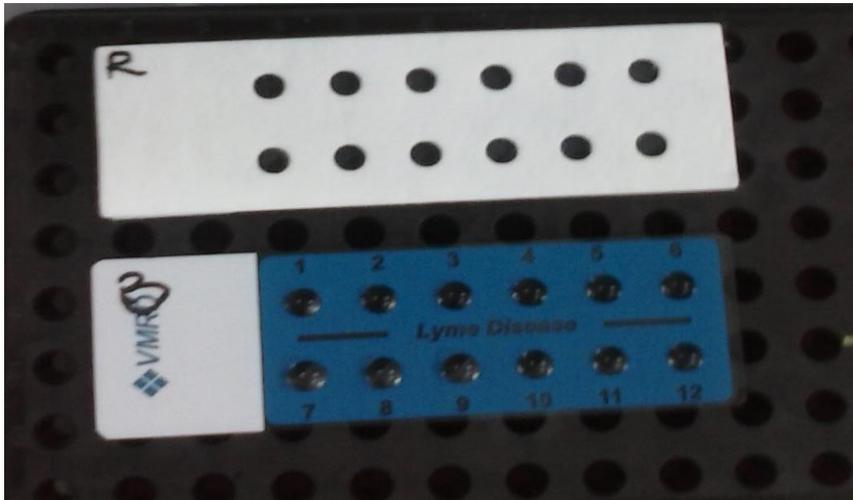
8.- Se drenaron los pocillos para luego sustituirlos con la ayuda de una micropipeta por buffer de enjuague 1X (pH 9) y dejarlos remojando durante 10 minutos.

Figura 11.1.8. Remoje con buffer de enjuague



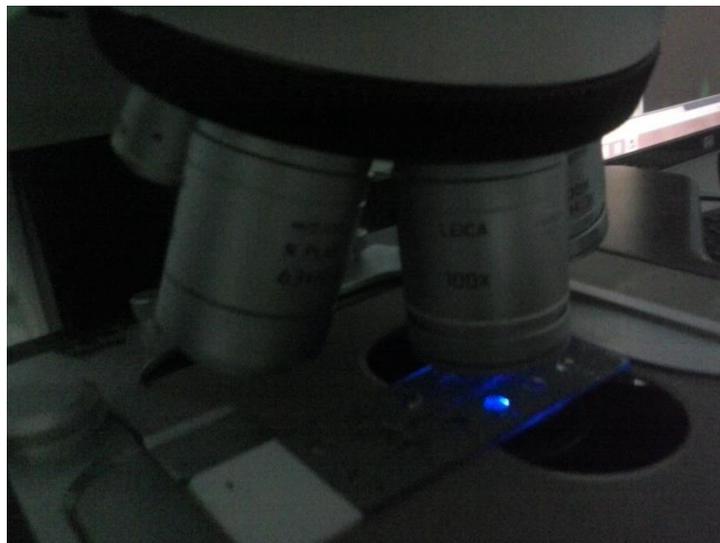
9.- Se Dreno la laminilla secando alrededor de los pozos pulsando con papel absorbente. Sin permitir que los pocillos se secan. Se montó con líquido de montaje [glicerol/buffer de enjuague 1X (pH 9), en proporción 50:50].

Figura 11.1.9. Drenaje y aplicación de líquido de montaje



10.- Se observó en el microscopio de fluorescencia Leica a 100X.

Figura 11.1.10. Observación de IFI en 100X.



Elaboración de los buffers

Los buffers se elaboraron de la siguiente manera: Se pesaron los ingredientes necesarios para la elaboración los dos buffers requeridos para la realización de la inmunofluorescencia (Cuadro 11.1.1. y Cuadro 11.1.2.), los cuales se deben mantener entre 2- 7 ° C.

Figura 11.1.11. Pesaje de reactivos para buffers.

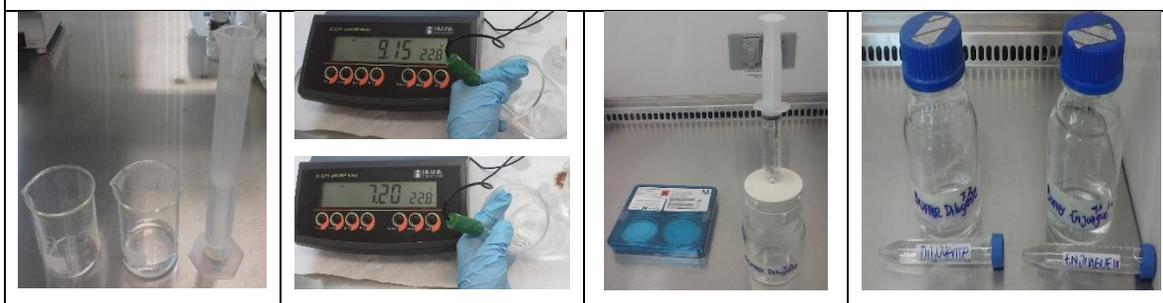


Cuadro 11.1.1. Suero búfer diluyente (pH 7.2).			
	1 Litro dH2O	100 MI dH2O	50 MI dH2O
Na₂HPO₄ (Fosfato dibásico de sodio).	1.19 gr	.119 gr	.0595 gr
NaH₂PO₄ (Fosfato monobásico de sodio).	0.22 gr	.022 gr	.011 gr
NaCl (Cloruro de Sodio).	8.55 gr	.855 gr	.4275 gr
BSA (Albumina sérica bovina).	10 gr	1 gr	.5 gr

Cuadro 11.1.2. 4XFA Buffer de Enjuague (pH 9-9.5).			
	1 Litro dH2O	100 MI dH2O	50 MI dH2O
Na₂CO₃ (Carbonato de sodio).	11.14 gr	1.14 gr	.57 gr
NaHCO₃ (Bicarbonato de sodio).	33.6 gr	3.36 gr	1.68 gr
NaCl (Cloruro de Sodio).	8.55 gr	.855 gr	.425 gr

Se puso un vaso de precipitado en la parrilla con dos magnetos y se colocó 50% del volumen total de agua destilada necesario y se fueron agregando los reactivos correspondientes, manteniéndose en agitación hasta que desaparezca el sedimento. Posteriormente se ajustó el pH y una vez realizado se agregó el 50% restante de agua destilada y se filtra filtró para esterilizarse. Se mantuvo en refrigeración hasta su uso, el cual no excedió una semana post preparación del buffer en cuestión.

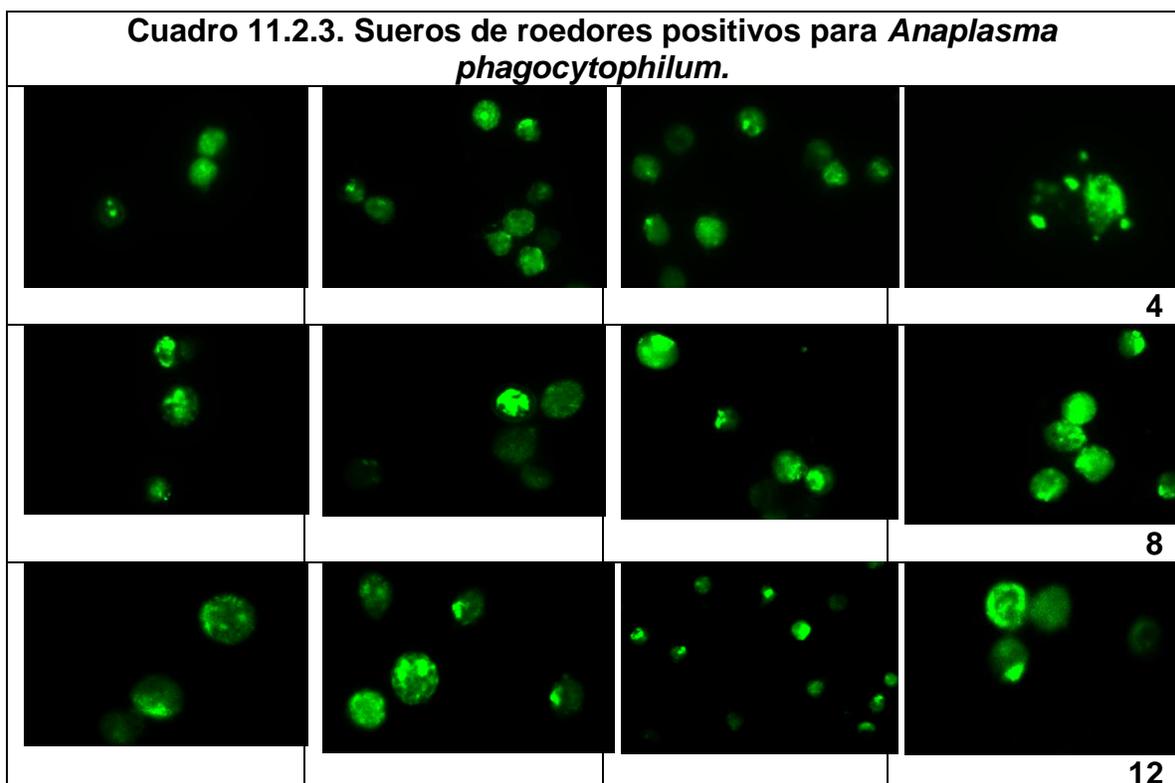
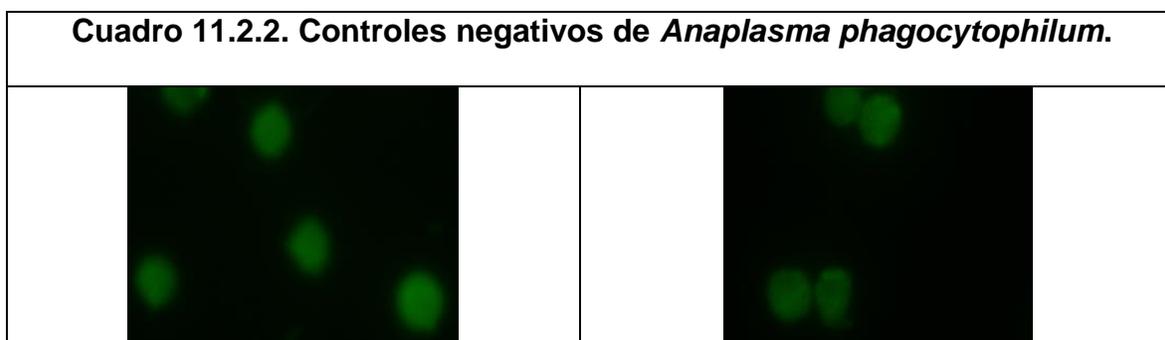
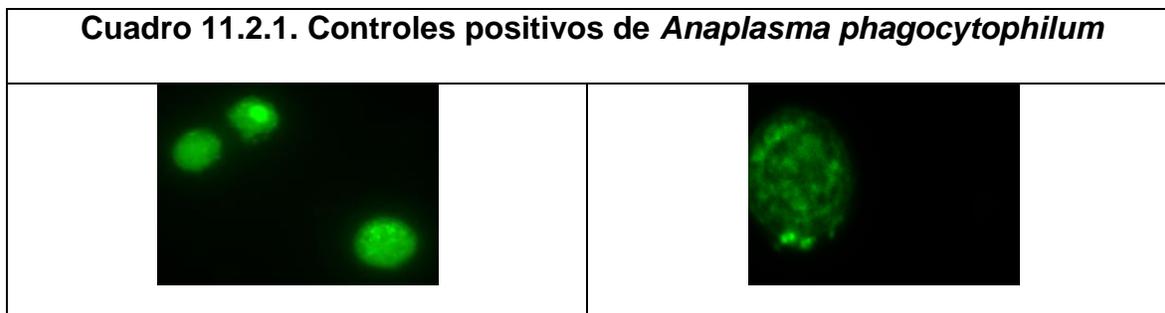
Cuadro 11.1.3. Preparación del buffer de enjuague y el buffer de dilución.

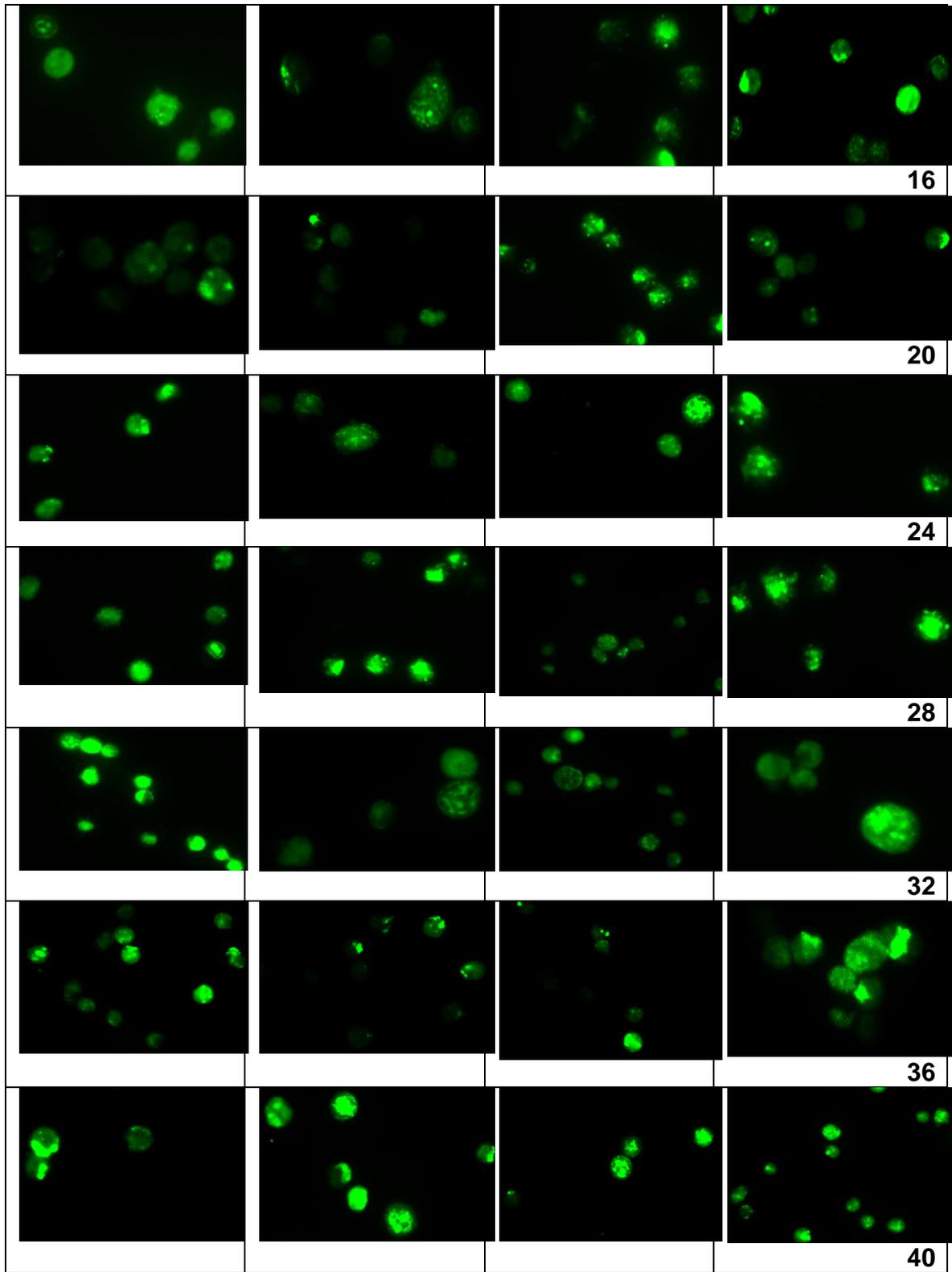


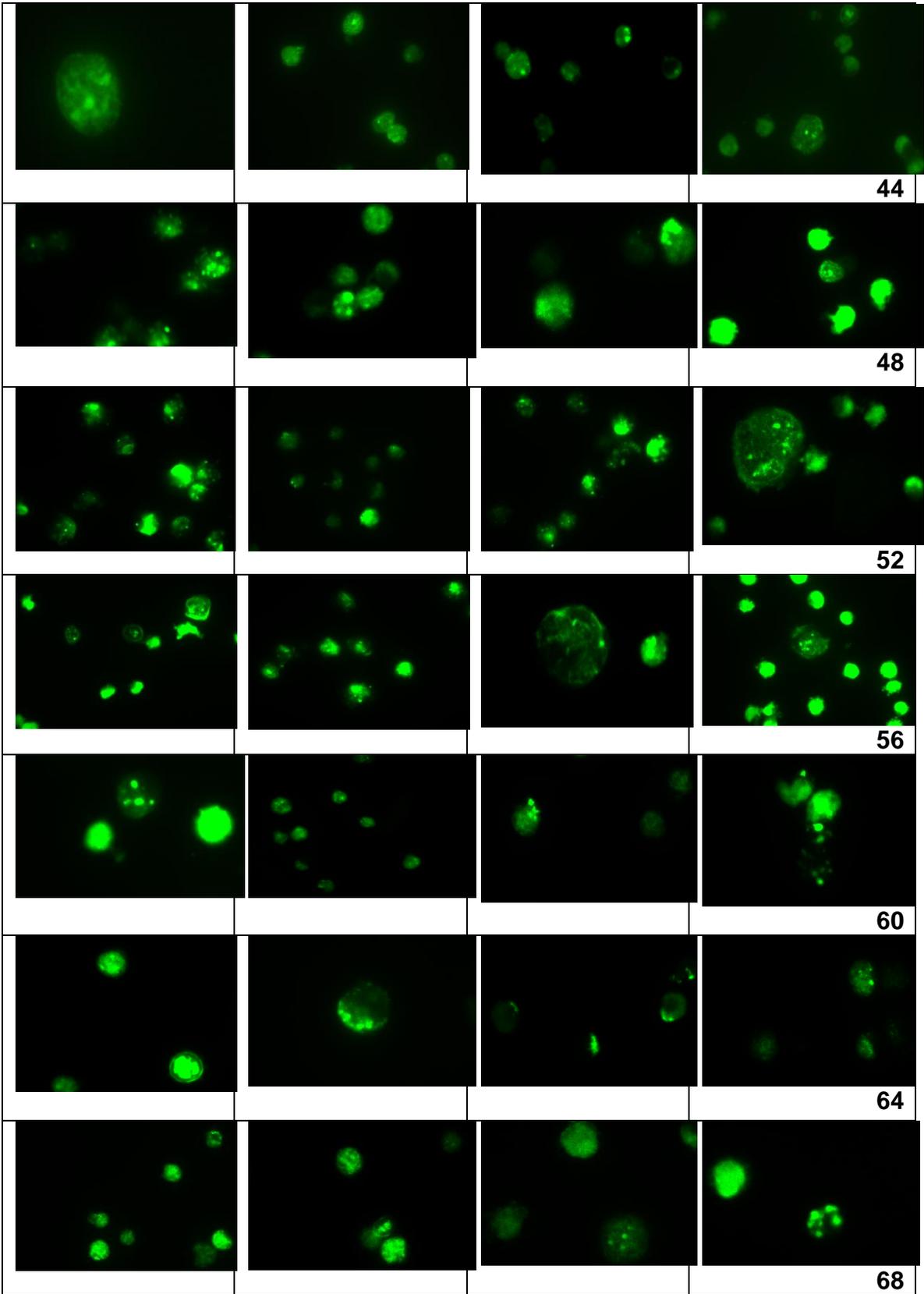
El buffer de enjuague es un concentrado 4X, por lo que para usarse como glicerol y/o buffer de enjuague se debe diluir con ¼ dl / agua destilada.

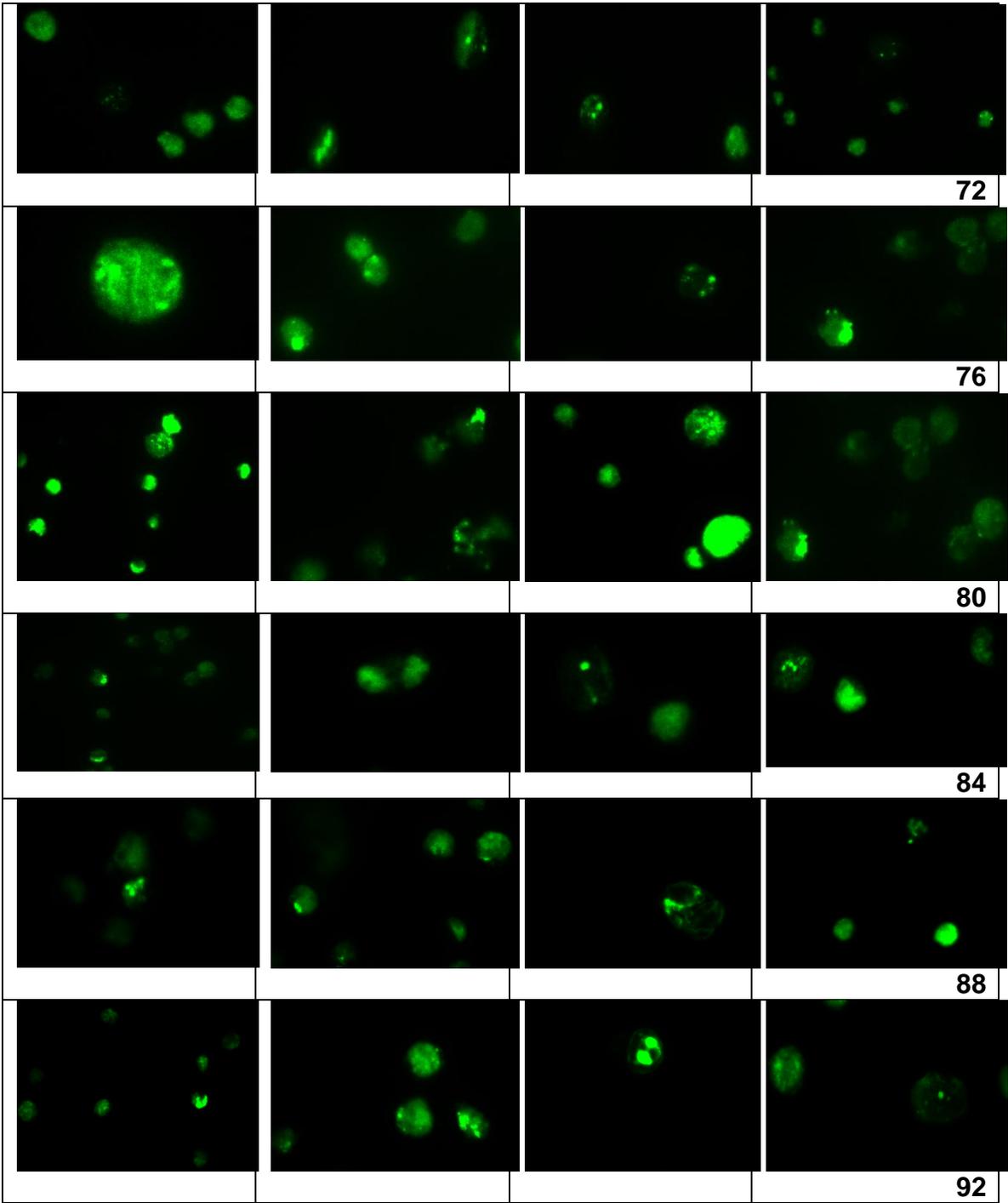
Anexo 2. Imágenes obtenidas por IFI para los distintos patógenos.

Imágenes de IFI para *Anaplasma phagocytophilum*.

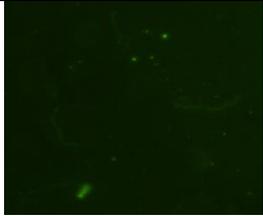
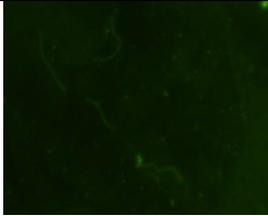




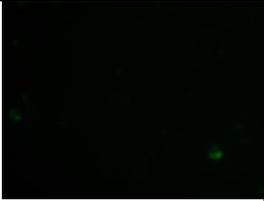




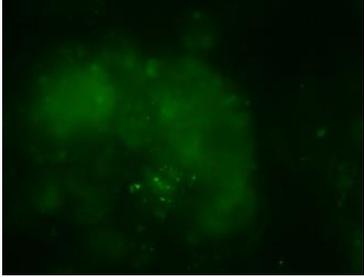
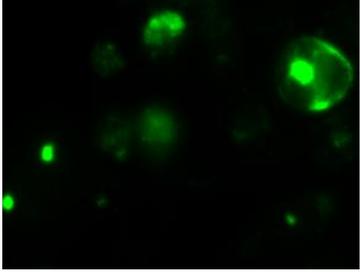
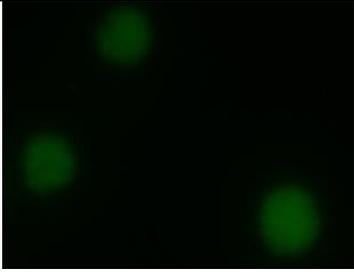
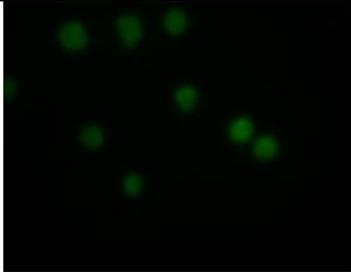
Imágenes de IFI para *Borrelia burgdorferi*.

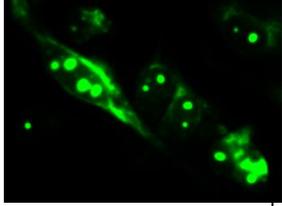
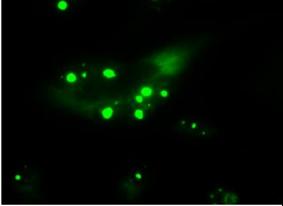
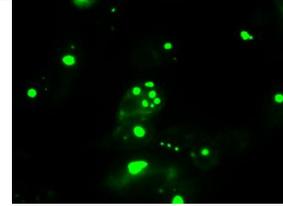
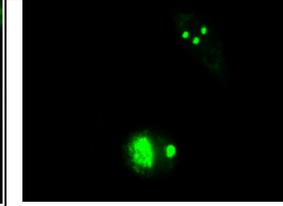
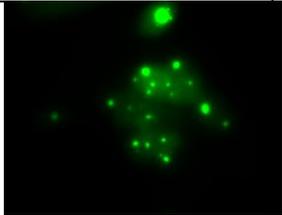
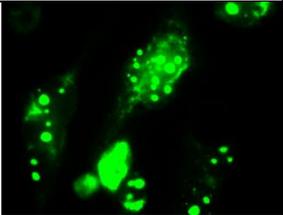
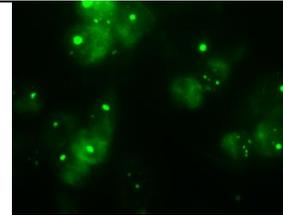
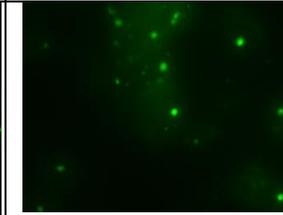
Cuadro 11.2.4. Controles Positivos de <i>Borrelia burgdorferi</i> .	
	

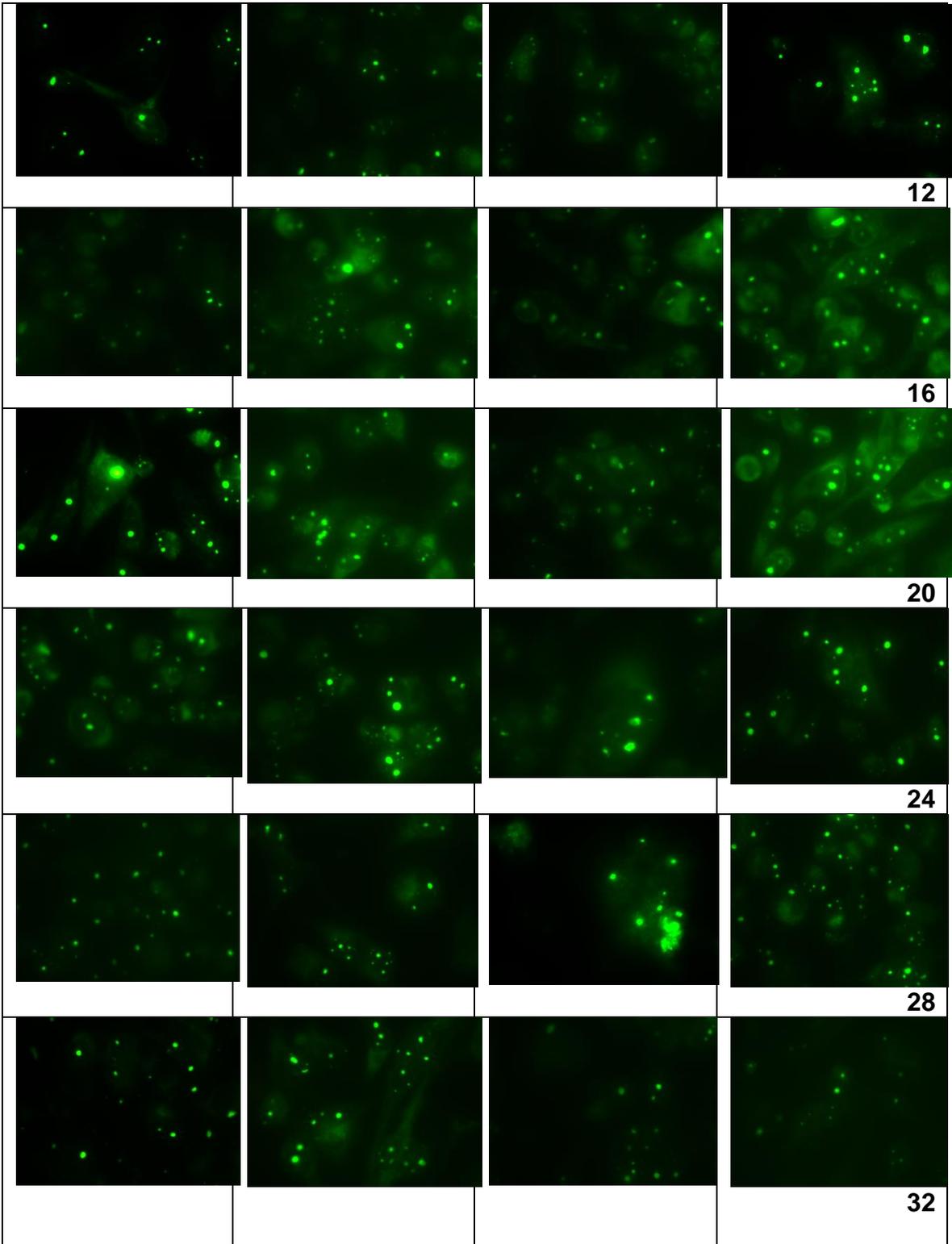
Cuadro 11.2.5. Controles Negativos de <i>Borrelia burgdorferi</i> .	
	

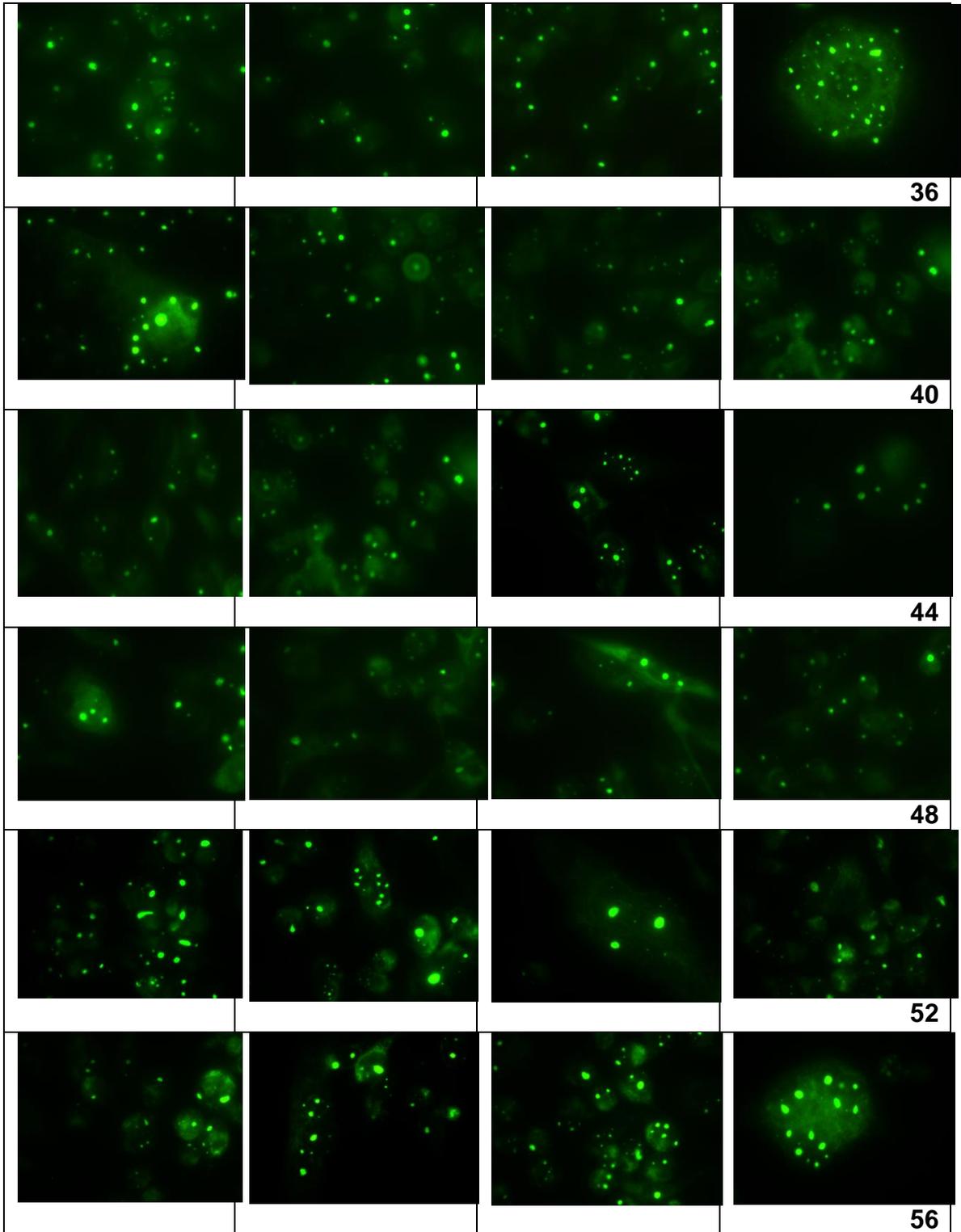
Cuadro 11.2.6. Sueros de <i>Borrelia burgdorferi</i> .			
			
1	5	10	20
			
30	40	50	60
			
70	80	90	92

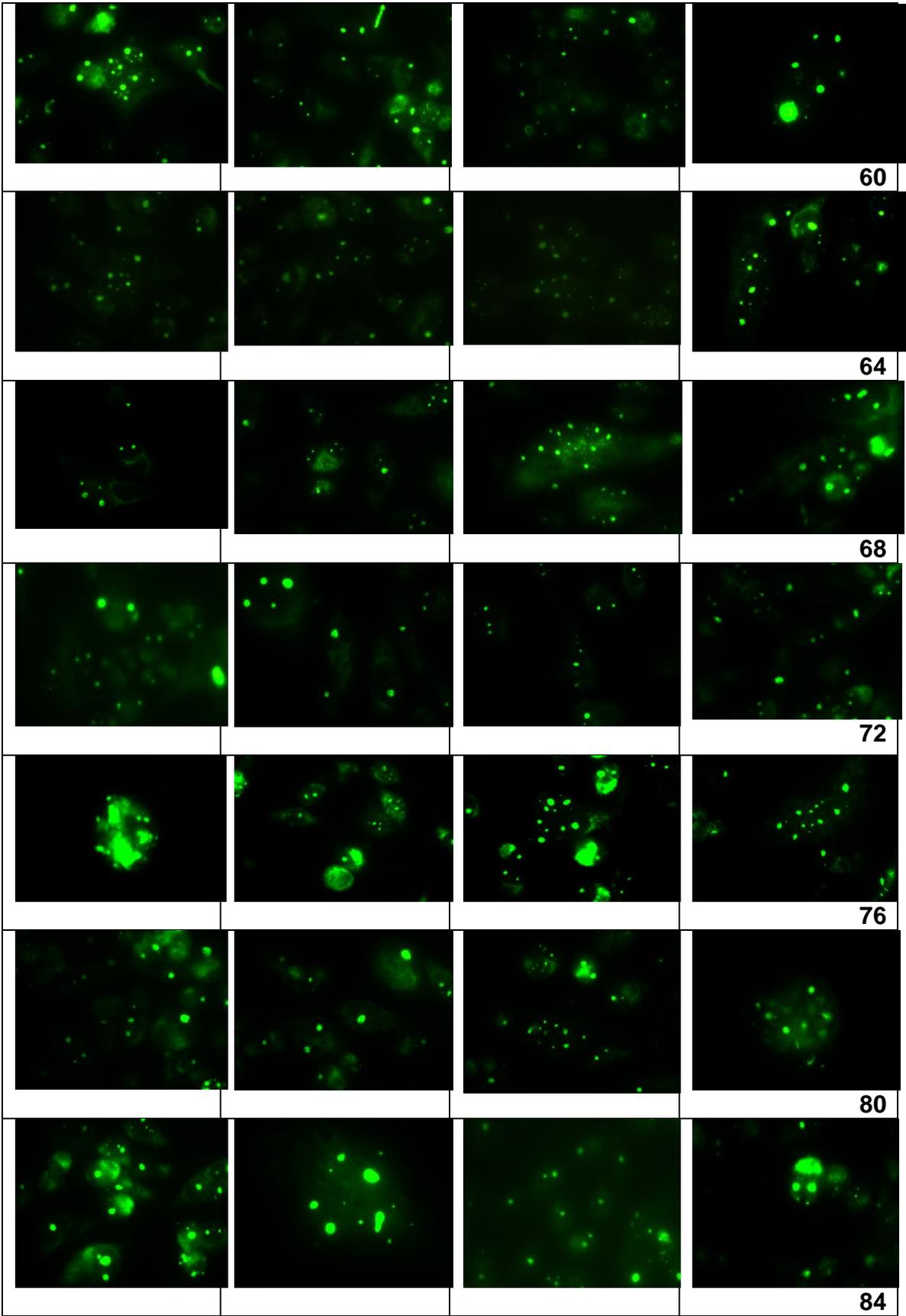
Imágenes de IFI para *Ehrlichia canis*.

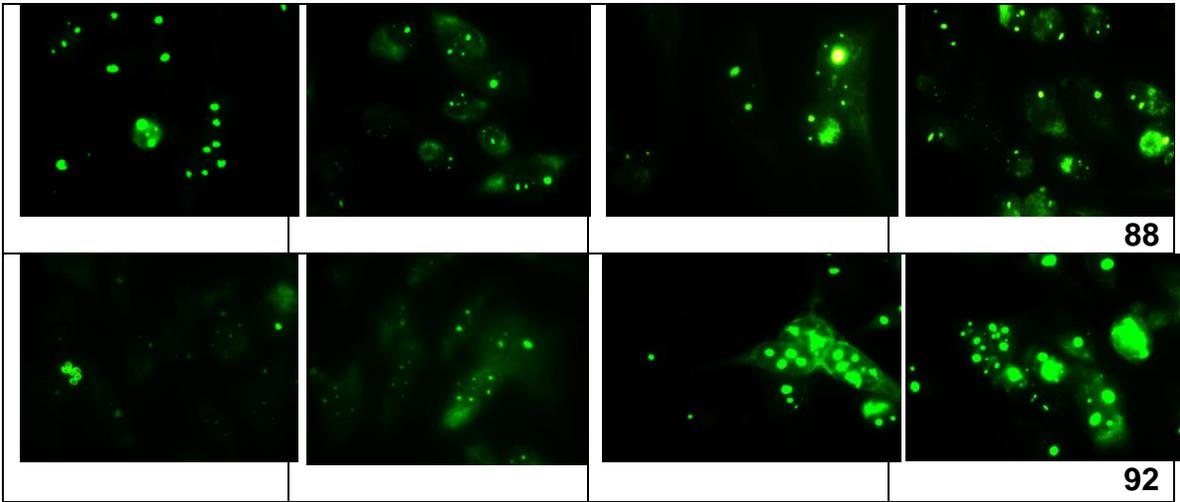
Cuadro 11.2.7. Controles positivos de <i>Ehrlichia canis</i> .	
	
Cuadro 11.2.8. Controles negativos de <i>Ehrlichia canis</i> .	
	

Cuadro 11.2.9. Sueros de roedores positivos para <i>Ehrlichia canis</i> .			
			
			4
			
			8

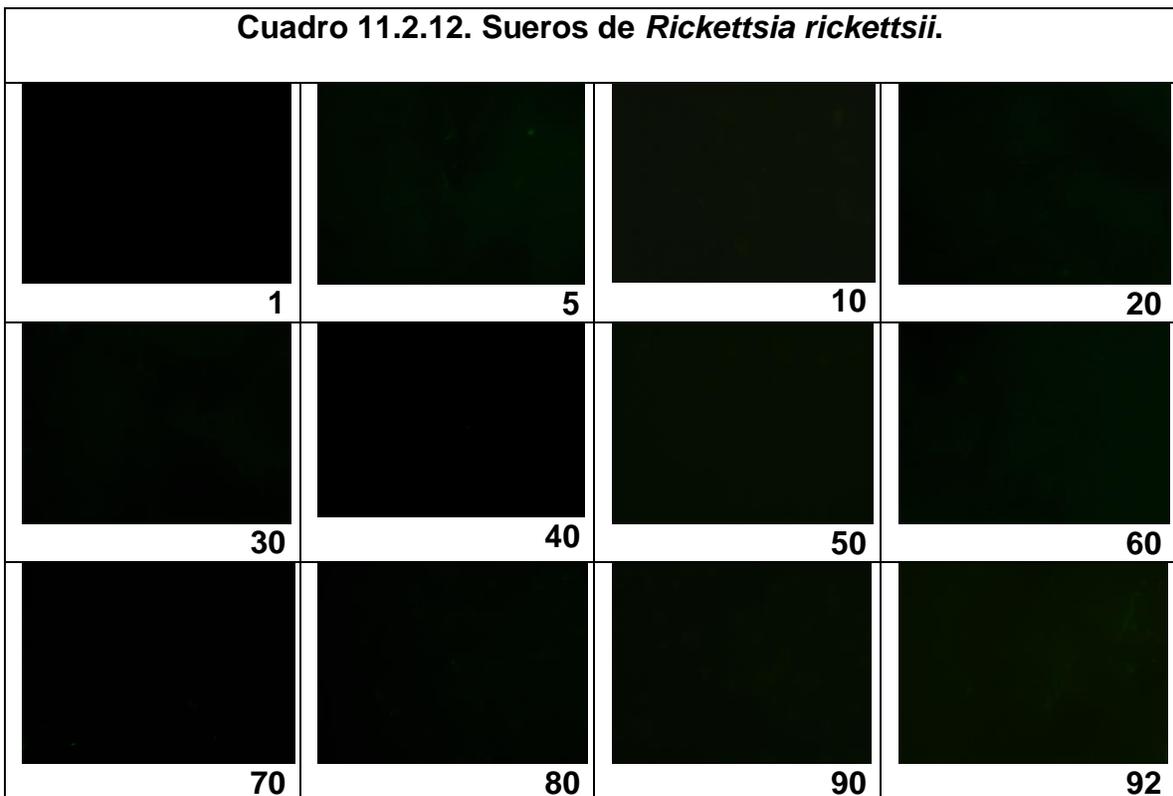
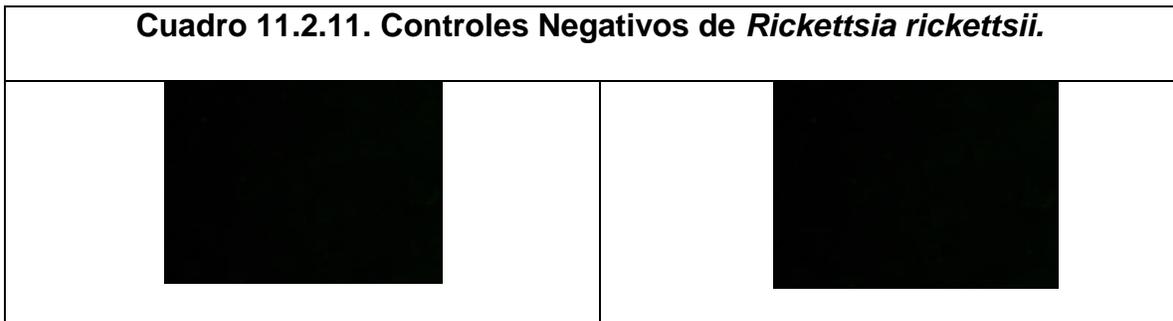
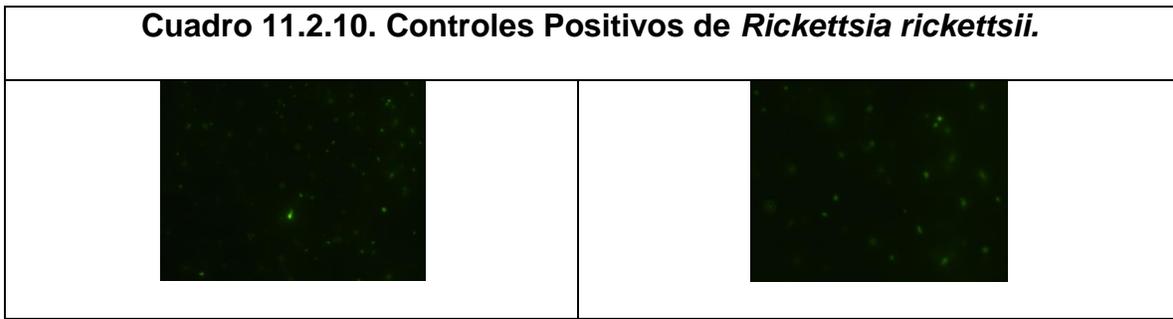








Imágenes de IFI en busca de *Rickettsia rickettsii*.



Anexo 3. Estandarización de la técnica de IFI

En la primera IFI realizada se siguió el protocolo incluido en las laminillas de Vmrd para identificación de *Rickettsia rickettsii*. La dilución de la proteína G fue de 1:100, pero no se observó fluorescencia en ningún pozo, incluyendo el control positivo.

Por lo que se procedió a probar diluciones de la proteína G, de manera que se logrará observar adecuadamente la fluorescencia, realizándose en base al mismo protocolo que propone Vmrd, pero en una laminilla con sangre de bovino infectado con *B. bigemina*, en los pozos hechizos de la laminilla se colocó sueros de bovinos infectados, con el fin de evaluar las diluciones del anti-anticuerpo marcado, probando con 1:20, 1:50, 1:75 y 1:100. Como control positivo y negativo se utilizaron sueros de bovino anteriormente examinados. Al observar al microscopio no se encontraron suficientes células teñidas debido a que se desprendieron.

La tercera prueba fue en un frotis sangre de bovino infectado con *B. bigemina* y fijado con cetona al 100 % durante 10 min, variando el protocolo usado en los siguientes puntos: usar 7 µL de suero problema, enjuague doble post incubación con PBS durante 5 minutos y un tercer enjuague con agua destilada por 20 minutos. Nuevamente solo se ve una leve señal de Alexa fluor 488, pero no se aprecian las células teñidas.

La cuarta prueba cambio los siguientes aspectos con respecto a la prueba del día anterior: la laminilla se atempero en campana de flujo laminar, se usaron 2 sueros positivos a *B. bigemina* y dos negativos, a una dilución de 1:80 para usarlos como controles positivos y negativos. Posteriormente se colocaron dos anticuerpos secundarios con el fin de verificar la eficiencia de la Proteína G. El anticuerpo secundario para Bovino se utilizó a dilución 1:100 y la proteína G a 1:20, 1:40, 1:80. La proteína G mostro buena tinción celular a dilución 1:20, y el anticuerpo secundario de bovino expreso excelente fluorescencia a 1:100.

En el quinto intento se utilizó una laminilla de *Rickettsia rickettsii* con el protocolo ya estandarizado, usando la proteína G a dilución 1:20 para evaluar los sueros problema, y un anti-IgG de roedor a dilución 1:100 para los pocillos designados a los controles positivo y negativo, resultando todos los sueros analizados negativos, pero observando fluorescencia en el control positivo.

El sexto intento se realizó en laminilla para *Borrelia burgdorferi*, en la cual se evaluaron los sueros del 1-10, saliendo todos, pero observándose el pozo del control positivo con buena fluorescencia. Este fue el protocolo ya estandarizado para todas las Inmunofluorescencias indirectas.

Bibliografía:

- Álvarez, C., y Bonilla, M., 2007. Adultos y Ninfas de la garrapata *Amblyomma Cajennense* Fabricius (Acari: Ixodidae) en equinos y Bovinos). *Rev. Biol. Trop.* 31(1): 61-69.
- Bakken, J., Dumler, J., Chen, S., Eckman M., Van, L., Walker, D., 1994. Human granulocytic ehrlichiosis in Wisconsin and Minnesota: a new species emerging?. *Journal of the American Medical Association*, 272: 212
- Bakken, J., y Dumler, J., 2000. Human granulocytic Ehrlichiosis. *Clinical Infectious Diseases*, 31: 554-560.
- Bakken, J., Haller, I., Riddell, D., Walls, J., Dumler, J., 2002. The serological response of patients infected with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis.* 34 (1):22–27.
- Bakken, J., Dumler, S., 2008. Human granulocytic anaplasmosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 22(3):433–448.
- Balows, A., 1975. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Eighth Edition. *American Journal of Public Health*, 65(3), 315.
- Brown, C., 2003. Virchow revisited: Emerging zoonoses. *ASM News* 69: 493-7.
- Collinge, S., Ray, C., 2006. *Community Epidemiology, Disease Ecology. Structure and Pathogen Dynamics*. 1st ed. Oxford New York. 217, 1-28.
- Cordero del Campillo, M., Rojo, F., Martínez, A., Sánchez, M., Hernández, S., Navarrete, I., Diez, P., Quiroz, H., Carvalho, M., 1999. *Parasitología Veterinaria*. 1a ed. Interamericana McGraw-Hill. Madrid, ES. 935, 134-151.
- Chapman, A., Bakken, J., Folk, S., Paddock, C., Bloch, K., Krusell, A., Sexton, D., Buckingham, S., Marshall, G., Storch, GA., Dasch, G, McQuiston, J., Swerdlow, D., Dumler, S., Nicholson, W., Walker, D, Eremeeva, ME., Ohl, C., 2006. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis – United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. *MMWR Recomm. Rep.* 55(RR4):1–27.
- Chen, S., Dumler, J., Bakken, J., y Walker, D., 1994. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 589-595.
- Daszak, P., Cunningham, A., Hyatt, A., 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. 78, 103-16.
- Dumler, J., Barbet, AF, 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 new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. International Journal for Systematical Evolutive Microbiology, 51(Pt 6): 2145-2165.

Dumler, J., Walker, D., 2001. Tick-borne Ehrlichiosis. Lancet Infectious Diseases. 21-28.

Ettinger, S., Feldaman, E., 2007. Tratado de Medicina interna Veterinaria. 6 ed. Madrid: Elsevier.

Euzeby, J., 2002. Dictionnaire de Bacteriologie Vétérinaire.

Foggie, A., 1951. Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. Journal of Pathology and Bacteriology, 63: 1-15.

Foggie, A. 1962. Studies on tick pyraemia and tick-borne fever. Symposium of the Zoological Society of London, 6: 51-58.

Gállego, B., 2007. Morfología y Biología de los Ixódidos. Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. Barcelona, España. 518, 388-395.

Garriti, G., 2002. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, second edition, Springer Verlag, Nueva York.

Guerrero, A., Losada, I., Lucas, S., y Oteo, J., 2001. Infección por Ehrlichia en España o reacciones cruzadas. Medicina Clínica, 116: 315-317.

Gordon, W., Brownlee, A., Wilson, D., y McLeod, J., 1932. Tick-borne fever. Journal of Comparative Pathology, 45: 301-302.

Horak, I., Camicas, J., Keirans, J., 2002. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. Exp Appl Acarol. 28, 27-54.

Inokuma, H., Brouqui, P., Drancourt, M., y Raoult, D., 2001a. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of Ehrlichia. Journal of Clinical Microbiology, 39: 3031-3039.

Inokuma, H., Terada, Y., Kamio, T., Raoult, D., y Brouqui, P., 2001b. Analysis of the 16S rRNA gene sequence of Anaplasma centrale and its phylogenetic relatedness to other ehrlichiae. Clinical Diagnosis and Laboratory Immunology, 8: 241- 244.

Junquera, P. 2015. Biología general de las garrapatas parásitas del ganado bovino, ovino, caprino, porcino y aviar, caballos, perros y gatos.

- Krauss, H., Weber, A., Appel, M., Enders, B., Isenberg, H., Schiefer, H., Graevenitz, A., Slenczka, W., Zahner, H., 2003. Zoonoses: Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans. 3rd Ed. Washington, DC., pp. 456.
- Lewis, G., Huxsoll, D., Ristic, M., y Johnson, A., 1975. Experimentally induced infection of dogs, cats and non-human primates with *Ehrlichia equi*, etiologic agent of equine ehrlichiosis. American Journal of Veterinary Research, 36: 85-88.
- Magnarelli, L., Stafford, K., Mather, T., Yeh, K., Horn, K., Dumler, J., 1995. Hemocytic rickettsia-like organisms in ticks: serologic reactivity with antisera to Ehrlichiae and detection of DNA of agent of human granulocytic ehrlichiosis by PCR. J. Clin Microbiol. 33(10): 2710-2714.
- Márquez, F., Hidalgo, A., Contreras, F., Rodríguez, J., y Muniain, M., 2005. Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. Enferm Infecc Microbiol Clin. 23, 94-102.
- Pavlovsky, E., 1964. Natural Nidality of Transmissible Diseases. In Relation to Landscape Epidemiology of Zoonothronoses. The Challenge of Epidemiology: Issues and Selected Readings. 1st ed. Pan American Health Organization, Washington, D.C. 991, 401-406.
- Parola, P., Beati, L., Cambon, M., Brouqui, P., Raoult, D., 1998. Ehrlichial DNA amplified from *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in France. Journal of Medical Entomology, 35: 180-3.
- Parola, P., Davoust, B., Raoult, D., 2005. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. Vet. Res. 36(3):469–492.
- Parola, P., Paddock, C., Raoult, D., 2005. Tickborne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. Clin Microbiol Rev; 18:719-56.
- Parola, P., Socolovschi, C., Jeanjean, L., 2008. Warmer weather linked to tick and emergence of severe rickettsioses PLoS Neg Trop Dis; 2: e328.
- Petrovec, M., Sixl, W., Schweiger, R., Mikulasek, S., Elke, L., Wüst, G., Marth, E., Strasek, K., Stünzner, D., Avsic-Zupanc, T., 2003. Infections of wild animals with *Anaplasma phagocytophila* in Austria and the Czech Republic. Ann. NY Acad. Sci. 990:103–106.
- Popov, V., Han, V., Chen, S., Feng, H., Andreadis, J. T., Tesh, R., y Walker, D., 1988. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. Journal of Medical Microbiology, 47: 235-251.

- Petrovec, M., Lotric-furlan, S., Avsic-zupanc, T., Strle, F., Brouqui, P., Roux, V., Dumler, J., 1997. Human disease in Europe caused by a granulocytic Ehrlichia species. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 1556-1559.
- Ribeiro, J. Vachereau, A., Modi, G., Tesh, R., 1989. A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Science*. 243, 212 - 214.
- Richter, P., Kimsey, R., Madigan, J., Barlough, J., Dumler, J., y Brooks, D., 1996. *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) as a vector of *Ehrlichia equi* (Rickettsiales: Ehrlichiae). *Journal of Medical Entomology*, 33: 1-5
- Rodríguez, R., Albornoz, R., Bolio, M., 2005. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Veterinary Parasitology* 127: 75-79.
- Stannard, A., Gribble, D., y Smith, R., 1969. Equine ehrlichiosis: a disease with similarities to Tick-borne fever and bovine petechial fever. *The Veterinary Record*, 110: 149-151.
- Telford, S., Dawson, J., Katavolos, P., Warner, C., Kolbert, C., Persing, D., 1996. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 93(12):6209–6214.
- Weiss, R., 2001. The Leeuwenhoek lecture Animal origins of human infectious diseases. *Phil Trans R Soc Lond B*. 356, 957-977.
- Woolhouse, M., 2006. Where do emerging pathogens come from? Understanding the origins of pathogens will help us to combat diseases. *Microbe*, Vol 1, 511, 511-515.