



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**SALUD PÚBLICA-EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR**

**GENOTIPIFICACIÓN DE LOS AGENTES PATÓGENOS CAUSALES DE ENFERMEDADES RICKETTSIALES  
TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODOS OBTENIDOS DE MUESTRAS DE VECTOR, ROEDOR Y  
PACIENTES EN LA REPÚBLICA MEXICANA**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**  
**CAROLINA GUADALUPE SOSA GUTIÉRREZ**

**TUTOR**  
**DR. EN C. JOSÉ ALVARO AGUILAR SETIÉN**  
**UIM-CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**  
**DRA. EN C. MARÍA GUADALUPE GORDILLO PÉREZ**  
**DR. EN C. JAVIER TORRES LÓPEZ**  
**UIM-CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI**

**MÉXICO, D.F. ABRIL, 2016.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ÍNDICE

Contenido	Página
<b>DEDICATORIA</b>	I
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	II
Resumen	1
Abstract	3
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	5
<b>II. REVISIÓN DE LA LITERATURA</b>	7
2.1 Agentes etiológicos	7
2.2 Epidemiología mundial de TBRD	8
2.2 Epidemiología en México	12
2.2 Epidemiología del vector	13
2.3 Ciclo de vida y ecología del vector	15
2.3.1 Epidemiología de las enfermedades transmitidas por garrapatas	17
2.4 Manifestaciones clínicas	19
2.5 Métodos diagnósticos	22
2.5.1 Frotis sanguíneo	22
2.5.2 Diagnóstico molecular por PCR	23
2.5.3 Análisis de DNA por secuenciación	23
<b>III. Development of multiplex PCR for detection of <i>Ehrlichia chaffeensis</i> and <i>Ehrlichia canis</i></b>	25
Resumen	26
Abstract	26
Introducción	27
Material y Métodos	28
Resultados	29
Discusión	29
Conclusión	30
Literatura citada	30
<b>IV. Primer análisis filogenético de <i>Ehrlichia canis</i> en perros y garrapatas de México (Estudio preliminar)</b>	33
Resumen	34
Abstract	35
Introducción	36
Material y Métodos	36
Resultados	37
Discusión	39
Referencias	44
<b>V. Tick-borne rickettsial pathogens in questing ticks, removed from humans and animals in Mexico</b>	46
Resumen	47
Abstract	48
Introducción	49
Material y Métodos	50
Resultados	52
Discusión	55

Referencias	60
<b>VI. Fatal Human Monocytic Ehrlichiosis in a 31-year old woman, Mexico</b>	<b>65</b>
Resumen	66
Abstract	66
Introducción	67
El estudio	67
Referencias	72
<b>VII. Impact of climate change on the distribution of <i>Rhipicephalus sanguineus</i> the competent vector of <i>Ehrlichia canis</i>, the agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis in Mexico</b>	<b>74</b>
Resumen	75
Abstract	76
Introducción	77
Material y métodos	79
Resultados	82
Discusión	83
Conclusión	86
Referencias	89
<b>VIII. DISCUSION</b>	<b>93</b>
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	<b>100</b>
<b>X. LITERATURA CITADA</b>	<b>101</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Página
Cuadro 1. Epidemiología de TBRD*	11
Cuadro 2. Manifestaciones clínicas de TBRD.	20
III. Cuadro 1. Iniciadores utilizados para la reacción de PCR multiplex.	28
IV. Cuadro 1. Manifestaciones clínicas presentadas en perros con Ehrlichiosis.	38
IV. Cuadro 2. Identificación, estadio evolutivo y resultados de las garrapatas colectadas.	38
IV. Cuadro 3. Frecuencia de sustitución (%) entre los aislados de <i>Ehrlichia canis</i> de perros y garrapatas con los aislados encontrados en el continente Americano.	41
V. Cuadro 1. Sitios colectados y esta evolutivo de las garrapatas.	53
V. Cuadro 2. Especies de garrapatas, número de grupos de garrapatas y garrapatas positivas.	54
VII. Cuadro 1. Estados, localidades y número de <i>R. sanguineus</i> colectadas en México, para construir el modelo.	81
VII. Cuadro 2. Variables exploratorias usadas para la construcción del modelo.	83
VII. Cuadro 3. Valores del Área bajo la curva (AUC) después de MaxEnt.	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1. Distribución geográfica de TBRD en el mundo.	9
Figura 2. Mapa de distribución de casos humanos de TBRD en México.	13
Figura 3. Ciclo de vida de la garrapata.	16
III. Figura 1. A) Prueba de sensibilidad para <i>E. canis</i> , B) prueba de sensibilidad para <i>E. chaffeensis</i> y C) prueba para ambas bacterias.	29
IV. Figura 1. Análisis filogenético del gene 16SrRNA de <i>Ehrlichia canis</i> , de las secuencias de los países Americanos construido mediante el método de Máxima verosimilitud.	42
IV. Figura 2. Análisis filogenético del gene 16SrRNA de <i>Ehrlichia canis</i> , de las secuencias de los países Americanos construido mediante el método de Máxima parsimonia.	43
V. Figura 1. Distribución de las garrapatas colectadas en México.	55
V. Figura 2. Árbol filogenético de los patógenos detectados en las garrapatas colectadas sobre hospederos animales y humanos en México.	56
V. Figura 3. Distribución de los patógenos Rickettsiales detectados en las garrapatas colectadas alrededor de México.	57
VI. Figura 1. Lesiones A y B. necróticas. C, agrupaciones de células en el lóbulo del hígado. E, inmunohistoquímica (CD68). F, células multinucleares.	69
VI. Figura 2. Prueba de IFA. A-C: control positivo de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> .	70
VII. Figura 1. Distribución geográfica de las garrapatas utilizadas para la construir de los modelos.	80
VII. Figura 2. Distribución del hábitat considerado estable de la garrapata competente <i>R. sanguineus</i> .	84
VII. Figura 3. Distribución del hábitat para <i>R. sanguineus</i> obtenido mediante máxima-entropía.	85
VII. Figura 4. Distribución futura (2050) del hábitat de <i>R. sanguineus</i> obtenido con máxima-entropía.	87

## Resumen

Las enfermedades Rickettsiales transmitidas por garrapata, son enfermedades zoonóticas emergentes de distribución mundial, y causales de graves problemas de salud con importancia médica y veterinaria. Los agentes patógenos causales son: *Rickettsia rickettsii*, agente causal de Fiebre Manchada de las Montañas Rocallosas, *Anaplasma phagocytophilum*, el agente causal de Anaplasmosis Granulocítica Humana; *Ehrlichia chaffeensis*, agente causal de la Ehrlichiosis Monocítica Humana; y finalmente *E. canis*, agente de Ehrlichiosis Monocítica Canina. La principal vía de transmisión, es la mordedura de la garrapata. Todas causan manifestaciones clínicas similares, pero con características epidemiológicas diferentes. Indudablemente, estas bacterias en su conjunto están presentes en México, dada las evidencias presentadas. Siendo un grave problema el subdiagnóstico en las Unidades Médicas y hospitalarias del país, y por lo tanto, con tratamiento tardío, y sus consecuencias en la evolución a formas graves e incluso mortales. En el presente escrito, se muestran las diferentes evidencias de su presencia, frecuencia, genotipificación y manifestaciones clínicas en pacientes. Se muestra el desarrollo de una PCR multiplex para detectar el gene *GroEL* de *E. canis* y *E. chaffeensis*, encontrando una sensibilidad de 16 y 24 copias por reacción, respectivamente; y una alta especificidad cuando se sometió a DNA de otras bacterias genéticamente cercanas. En base a esto se buscó la relación filogenética de *E. canis* en perros naturalmente infectados y garrapatas alrededor del país, para compararlas con diferentes secuencias del gene *16SrRNA* publicadas en el continente Americano; teniendo como resultado tres clados, de los cuales las muestras obtenidas en México conforman un clado independiente. Es necesario profundizar en el tema y utilizar un gene con mayor variabilidad. En la búsqueda de estos patógenos en el vector competente y/o potencial, se realizó una colecta en 101 sitios alrededor de México, obteniendo 1107 garrapatas de 16 especies, de las cuales se demostró la frecuencia de infección de 9.65 (42 garrapatas) para *E. canis*, 10% (44 garrapatas) *Anaplasma phagocytophilum*, 1.8% (8 garrapatas) *E. chaffeensis* y 2.2% (10 garrapatas) *R. rickettsii*. Teniendo una

fuerte evidencia de la presencia del vector en México. Se describió el primer registro de *E. chaffeensis* con resolución fatal para una paciente, de la cual se presentó evidencia clínica, serológica, molecular e histopatológica. Y finalmente, se estudió como la distribución presente del vector se verá afectada por el Cambio Climático en nuestro país, y con esto, el incremento en el riesgo de adquisición de alguno de estos patógenos. En este ciclo complejo de transmisión evaluamos a las garrapatas como vectores transmisores, mamíferos domésticos y silvestres como huésped, y finalmente el humano actuando como el último eslabón de la cadena de transmisión, actuando como un huésped accidental. Cabe destacar que las muestras de mamíferos y vectores fueron colectadas en México, descartando una posible importación de la enfermedad; demostrando de manera contundente la presencia del ciclo enzoótico en el país. Es de gran interés continuar con el estudio de estas enfermedades, los factores asociados y la interacción patógeno-huésped-vector, por el potencial de diseminación de la garrapata a nuevas áreas, y el grado de afección que pueden provocar.

**Palabras claves:** *Anaplasma phagocytophilum*; *Rickettsia rickettsii*; *Ehrlichia chaffeensis*; *E. canis*; garrapatas; humanos; zoonosis.

## Abstract

Tick-borne Rickettsial Diseases (TBRD) are emerging zoonotic diseases with a worldwide distribution, causes serious health problems with medical and veterinary settings. The causative pathogens are: *Rickettsia rickettsii*, agent of Rocky Mountains Spotted Fever; *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of Human Granulocytic Anaplasmosis; *Ehrlichia chaffeensis*, etiological agent of Human Monocytic Ehrlichiosis; and finally *E. canis*, agent of Canina Monocytic Ehrlichiosis. The main route of transmission is the tick bite. All cause similar manifestations, but with different epidemiological settings. Undoubtedly, these bacteria are present in Mexico, given the presented evidence. It is a serious underdiagnosis problem in Medical and hospital units in the country, and therefore, with delayed treatment, and its consequences on the evolution serious and even fatal. In this paper, we showed evidences of their presence, frequency, genotyping and clinical manifestations in patients. We developed a PCR multiplex to detect shown *GroEL* gene *E. canis* and *E. chaffeensis*, finding a sensitivity of 16 copies per reaction and 24, respectively; and high specificity when subjected to DNA of other bacteria genetically close. Based on this the phylogenetic relationship of *E. canis* in dogs naturally infected ticks around the country and was sought, to compare with different gene sequences *16SrRNA* published in the American continent; resulting in three clades, of which samples obtained in Mexico make an independent clade. It is necessary to delve into the subject and use a gene with greater variability. In the pursuit of these pathogens in the appropriate vector and/or potential, a collection was held at 101 sites around Mexico, obtaining 1,107 ticks of 16 species, of which the frequency of infection was 9.65% (42 ticks) for *E. canis*; 10% (44 ticks) *Anaplasma phagocytophilum*; 1.8% (8 ticks) *E. chaffeensis*; and 2.2% (10 ticks) *R. rickettsii*, it having a strong evidence of the presence in their vectors in Mexico. We described the first record of *E. chaffeensis* with fatal resolution for a patient, which we presented clinical, serological, molecular and histopathological evidence. And finally, it was studied as this vector distribution and their affection by climate change in our country, and with this, the increased risk of



acquisition of any of these pathogens. In this complex transmission, we evaluate ticks as vectors transmitters, domestic and wild mammals as a host, and finally the human acting as the last link between the transmission chains, acting as an accidental host. It should be noted that samples of mammals and vectors were collected in Mexico, descarting a possible import of the disease; conclusively demonstrating the presence of enzootic cycle in the country. Is a great interest to continue the study of these diseases, associated factors and the interaction between host-vector-pathogen, the potential for spread of ticks to new areas, and the degree of condition that can causes.

**Keywords:** *Anaplasma phagocytophilum*; *Rickettsia rickettsii*; *Ehrlichia chaffeensis*; *E. canis*; ticks; humans; zoonoses.

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades Rickettsiales transmitidas por garrapatas (TBRD) son enfermedades zoonóticas causadas por bacterias intracelulares obligadas y transmitidas por garrapatas Ixodidae o “garrapatas duras”. Este grupo está conformado por: Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR) el agente causal es *Rickettsia rickettsii* (*R. rickettsii*), Anaplasmosis Granulocítica Humana (HGA) por *Anaplasma phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*), Ehrlichiosis Monocítica Humana (HME) por *Ehrlichia chaffeensis* (*E. chaffeensis*) y Ehrlichiosis Monocítica Canina (CME) por *E. canis*. La distribución de estas enfermedades está relacionada con la distribución del vector. Su presencia se ha reportado en Asia, África, Europa y Estados Unidos<sup>1</sup>, Sin embargo, sólo la FMMR ha sido descrita en México y en algunos países de Sudamérica.

Entre 1984 y 2009, nueve especies de Rickettsias fueron identificadas como agentes emergentes transmitidos por garrapatas alrededor del mundo. Seis de estas especies han sido aisladas de garrapatas, después se aislaron en humanos causando la enfermedad. Las bacterias de la familia Anaplasmataceae era consideradas solo de importancia en medicina veterinaria, pero ahora cuatro especies han sido implicadas en la etiología de enfermedades en humanos, incluyendo: *E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum*, *E. ewingii* y recientemente *E. canis*<sup>2</sup>.

El diagnóstico se basa en la visualización de las mórulas dentro de la célula diana, detección del aumento de anticuerpos mediante Inmunofluorescencia indirecta, Western Blot (WB) o la demostración de DNA bacteriano mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)<sup>1</sup>.

Los criterios del CDC para diagnóstico de TBRD son:

Caso confirmado.- La presencia de manifestaciones clínicas de enfermedad aguda caracterizada por fiebre con cefalea, mialgias, rash, anemia, leucopenia, trombocitopenia o transaminasas hepáticas elevadas, seguida de náuseas, vómito y/o mal estado general con evidencia serológica por ELISA o IFA en muestras pareadas, muestras positivas mediante inmunohistoquímica en biopsia de piel o

autopsia de órganos, la demostración de DNA de la bacteria mediante PCR o cultivo celular de la bacteria.

Caso sospechoso: Datos clínicos de sospecha con evidencia serológica por ELISA o IFA o la identificación de la mórula en la célula diana <sup>3</sup>.

Las TBRD son enfermedades que presentan un comportamiento heterogéneo y se pueden confundir en la fase aguda con diferentes enfermedades: dengue clásico y hemorrágico, mononucleosis infecciosa, meningitis viral o bacteriana, encefalitis, sepsis, síndrome de abdomen agudo, fiebre tifoidea, descompensación de enfermedades metabólicas e influenza<sup>1</sup>.

Con base a los estudios realizados, considerando que son enfermedades zoonóticas emergentes con tasa de letalidad alta hasta del 25% si no se da tratamiento, así como el desconocimiento de los agentes etiológicos en el país o se han descritos poco y con el fin de establecer que elementos pueden estar participando en el ciclo silvestre o doméstico de cada una de las TBRD que integran este complejo. En el presente escrito se muestran sólidas evidencias que enfatizan la importancia del estudio de las TBRD; demostrando nuevas herramientas de diagnóstico, diferencias filogenéticas, frecuencia y distribución; además, en una cadena de transmisión lógica la afección en el humano como huésped accidental. Y finalmente, como éstos patógenos se verán influenciados por el cambio climático en su distribución y posterior afección a sus vectores y reservorios competentes.

## II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2.1 Agentes etiológicos

La tribu Anaplasmataceae está compuesta por bacterias intracelulares obligadas patógenas y no patógenas, las cuales infectan a invertebrados, aunque existen algunas especies que tienen como células blanco, las células hematopoyéticas de mamíferos y aves<sup>4</sup>. Compuestas por las familias Rickettsiaceae y Anaplasmataceae, se transmiten por la mordedura de vectores artrópodos excepto *Neorickettsia* spp, pudiendo causar enfermedades fatales como el tifo epidémico<sup>2</sup>. Los miembros de la familias Anaplasmataceae, están confinadas en una membrana que comparten con la célula huésped mientras que las bacterias de la familia Rickettsiaceae no<sup>1</sup>. Son patógenos del humano los siguientes: *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*, *E. canis*, *E. ewingii*, *R. rickettsii* y *Neorickettsia sennetsu* (*N. sennetsu*). Cabe señalar que de la familia Anaplasmataceae: *E. chaffeensis*, *E. canis* y *N. sennetsu*, primero fueron reconocidas como patógenos en medicina veterinaria antes de demostrarse que infectaban al humano. *Neorickettsia* spp. a diferencia de *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp., se transmite a los mamíferos por la ingestión de pescado o insectos acuáticos infectados de tremátodos<sup>13</sup>.

La primera bacteria de la familia Anaplasmataceae en ser reconocida como agente causal de Ehrlichiosis humana fue *N. sennetsu*. Esta bacteria ha sido aislada de sangre de muchos pacientes con signos similares a la mononucleosis infecciosa en Japón y Malasia, y recientemente ha sido detectada en pacientes de Laos<sup>6</sup>. La relación que existe en cada especie con la TBRD, se compara si las garrapatas identificadas se han reportado como vectores competentes<sup>7</sup> (aquellos que se han encontrado formando parte de un ciclo enzoótico donde están infectados y pueden transmitir la bacteria a un huésped mamífero entre ellos el hombre) o vectores potenciales (aquellas garrapatas que están infectadas con la bacteria pero no se ha demostrado que lo puede transmitir a los hospederos), los géneros de garrapatas incluyen a *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Amblyomma*<sup>7</sup> e *Ixodes*<sup>8,9,10</sup>.

## 2.2 Epidemiología mundial de TBRD

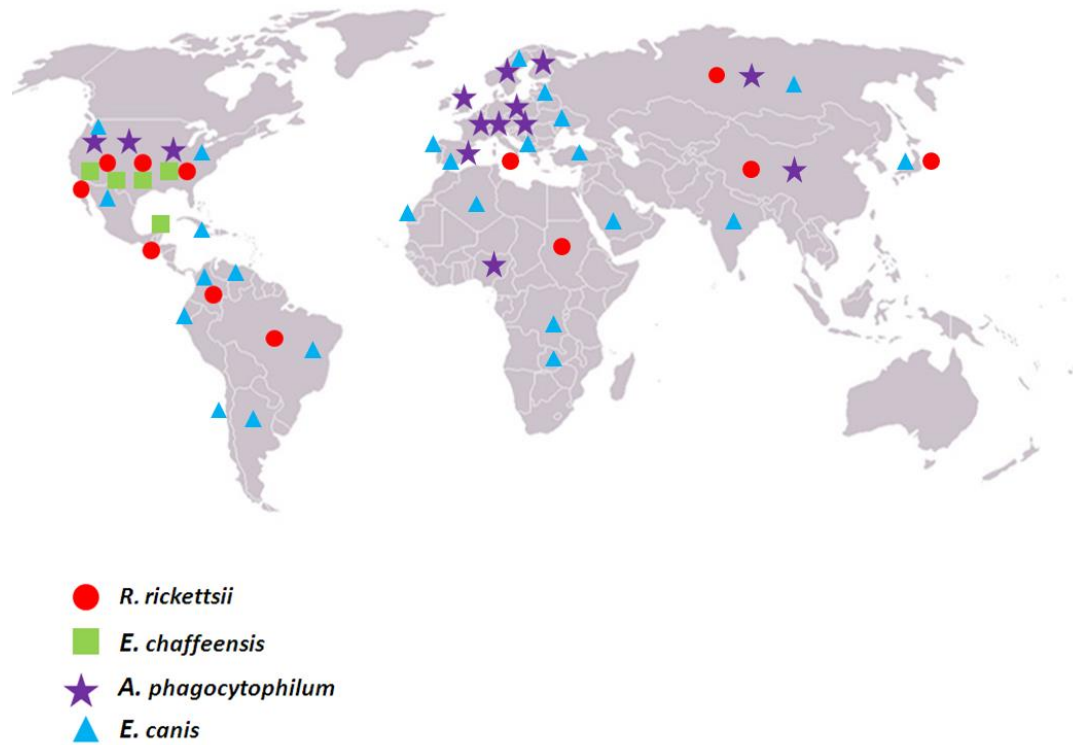
FMMR, HME, HGA y CME son zoonosis provocadas por *R. rickettsii*, *E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum* y *E. canis*, respectivamente; los cuales se mantienen en la naturaleza mediante un ciclo que incluye animales salvajes y las garrapatas de la familia *Ixodidae*. La epidemiología de estas enfermedades se refleja en la distribución geográfica (Figura 1)<sup>1</sup>, actividades estacionales de vectores, reservorios y el comportamiento del humano al integrarse cada vez más a zonas de riesgo con actividades físicas como senderismo y excursionismo, en los cuales pueden ser mordidos por la garrapata y subsecuentemente infectados (Cuadro 1). El 90-93% de los casos reportados en EUA a la CDC ocurren durante los meses de abril a septiembre, coincidiendo con el nivel más alto de actividad de las garrapatas y por ende la infección en humanos<sup>3</sup>.

Los hombres parecen presentar un mayor riesgo para adquirir alguna de las enfermedades, posiblemente porque tienen mayor actividad al aire libre o el riesgo ocupacional<sup>3,11</sup>. La FMMR presenta una mayor incidencia en niños <10 años, comparado con grupos de varias edades (20-40 y 40-60 años), en estudios previos presentados en EUA. Por otro lado HME y HGA tienen una mayor incidencia en personas >70 años y 60- 69 años, respectivamente<sup>1</sup>.

Dos estudios de cohortes en el sureste, centro y sur de EUA han demostrado que más del 22% de los niños presentaron evidencia de títulos serológicos de exposición a antígenos de *E. chaffeensis* y *R. rickettsii*, sugiriendo que la infección ehrlichial y rickettsial pueden ser más comunes de lo que se pensaba.

*R. rickettsii* es el agente de la FMMR en EUA, descrito en 1899 por Maxey; se creía el único agente del grupo de las enfermedades Rickettsiales en América en el siglo XX. Sin embargo, otros agentes del grupo de fiebre Rickettsiales han sido encontrados en garrapatas y considerados como no patógenas<sup>4</sup>. Entre 1984<sup>12</sup> y 2004, se re reportaron nueve especies o subespecies de rickettsias alrededor del mundo y consideradas ya como enfermedades zoonóticas emergentes en los diferentes países que se presentan<sup>13</sup>.

Figura 1. Distribución geográfica de TBRD en el mundo. Modificado de Parola *et al.*, 2001, Sosa *et al.*, 2011 y Tinoco *et al.*, 2009.



La Rickettsiosis es transmitida al humano a través de la mordedura de especies de garrapatas<sup>14</sup>. *Dermacentor variabilis* en el este, centro y costa del pacífico en EUA; *D. andersoni* en el oeste de EUA<sup>9</sup>, y *R. sanguineus* en México<sup>10</sup>. Durante 1997-2002, se estimó una incidencia basada en una vigilancia pasiva y fue de 2.2 casos por un millón de personas, más de la mitad de los reportes fueron solo en cinco estados del sur de EUA<sup>14</sup>, los cuales colindan con México. Las incidencias varían considerablemente con el área geográfica. La Rickettsiosis también es una enfermedad endémica en varios países en centro y sur América incluyendo Argentina, Brasil, Colombia, Costa Rica, Panamá y México<sup>15</sup>. En México al inicio del 2009 se detectó en el municipio de Mexicali, Baja California la presencia de la enfermedad. Se observaron 1,453 casos sospechosos, 734 casos probables y 278 casos confirmados. El grupo escolar fue el que presentó el 56% de los casos estudiados, el 58% fueron mujeres afectadas y 42% hombres. Presentándose la mayoría de los casos entre los meses de marzo a septiembre<sup>16</sup>.

Las bacterias del género *Ehrlichia* habían sido consideradas solo de importancia veterinaria, en años recientes han sido implicadas cuatro especies que causan enfermedad en los humanos<sup>17,18</sup>. El primer caso de Ehrlichiosis monocítica fue descrito en 1987 en EUA<sup>11</sup>, atribuyéndolo en un principio a *E. canis*. En 1991 se logró aislar la bacteria atribuyendo la responsabilidad a *E. chaffeensis*<sup>3</sup>. La HME es transmitida por la garrapata *Amblyomma americanum* y posiblemente por otras garrapatas. El venado cola blanca es el principal huésped competente en todos los estadios de esta garrapata y un importante reservorio natural de *E. chaffeensis*. Se ha documentado la infección natural de coyotes, perros, cabras y roedores de campo. El reporte promedio anual en EUA por la CDC de incidencia era de 0.7 casos por millón de humanos, pero esta varía por estados, como en Carolina del Norte donde la incidencia dobló a lo reportado para Rickettsiosis. El reporte de incidencia probablemente está subestimado en las áreas endémicas. En México se tiene el reporte de un caso de *E. chaffeensis* en el estado de Yucatán, el diagnóstico fue realizado mediante IFA el cual puede provocar reacciones cruzadas entre las diferentes especies de *Ehrlichia*<sup>18,19</sup>.

En 1994 fue descrita por primera vez la Ehrlichiosis Granulocítica en EUA y subsecuentemente se demostró la presencia en Europa. Se relacionó a *E. equi* y *E. phagocytophilum* (patógenos causantes de Ehrlichiosis en caballos y rumiantes, respectivamente). Sin embargo, estudios filogenéticos demostraron que las diferencias entre cada especie eran insuficientes para tratarse de organismos diferentes, y estas bacterias las reorganizaron en una y la denominaron *A. phagocytophilum* y su enfermedad fue renombrada como Anaplasmosis Granulocítica Humana (HGA)<sup>5</sup>. Su vector transmisor es la garrapata *Ixodes scapularis*<sup>18</sup>. El venado, alce y roedores de campo son reservorios. Los primeros casos de infección por HGA se describieron en Estados Unidos en 1994<sup>20</sup> donde esta enfermedad es más frecuente que HME, teniendo un reporte anual de 1.6 casos por millón durante 2001-2002. Los estados de mayor incidencia reportan hasta 36.5 casos por millón.

La garrapata *I. scapularis* también transmite *Borrelia burgdorferi* agente causal de la Enfermedad de Lyme, y varias especies de babesias, por lo que la propagación

de HGA puede estar distribuida como los otros agentes y algunas veces hay coinfección con éstas bacterias<sup>15</sup>. En México no se tienen antecedentes de esta enfermedad en humanos, solo un estudio seroepidemiológico en perros donde se obtuvo un 21% de prevalencia<sup>21</sup>. *E. canis* es la bacteria causal de la Ehrlichiosis monocítica canina (CME) la cual es una enfermedad crónica en los perros<sup>14,46</sup>, en el 1999 se demostró la presencia de infección en humanos y en el 2007 que era capaz de provocar enfermedad. En el 2011 se presentó el primer estudio epidemiológico con la presencia de manifestaciones clínicas de Ehrlichiosis monocítica en pacientes de Sinaloa, México<sup>22</sup>.

Cuadro1. Epidemiología de TBRD\*

Agente	Enfermedad	Garrapata vector	Distribución geográfica	Huésped vertebrado
<i>R. rickettsii</i>	Fiebre de las Montañas Rocosas	<i>Dermacentor variabilis</i>	Dos terceras partes de EUA, costa del pacífico	Roedores, coyotes, perros, ardillas y hombre.
		<i>D. andersoni</i>	Estados de las Montañas rocosas	
		<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Mundial	
		<i>Amblyomma cajennense</i> <i>A. aureolatum</i>	Centro y sur América	
<i>E. canis</i>	Ehrlichiosis monocítica canina	<i>R. sanguineus</i>	Mundial	Perros, chacal, coyote, perro salvaje africano, zorro gris y rojo.
<i>E. chaffeensis</i>	Ehrlichiosis monocítica humana	<i>A. americanum</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>Ixodes pacificus</i>	Sureste y centro de EUA. México.	Venado cola blanca, perro, coyote y cabras.
<i>A. phagocytophilum</i>	Anaplasmosis Granulocítica humana	<i>I. scapularis</i> , <i>R. sanguineus</i>	Noreste de EUA	Roedores <i>Peromyscus</i> , venados, alces, caballos, ardillas, chimpancés.
		<i>I. pacificus</i>	Costa del pacífico	Ardillas, ratas, caballos, llamas, venados, roedores.
		<i>I. ricinus</i>	Europa	Ciervos, roedores, venados, caballos, perros, gatos, ovejas.

\*Modificado de Walker *et al* 2008.



## 2.2 Epidemiología en México

La primera evidencia de las enfermedades Rickettsiales transmitidas por garrapatas (TBRD) en México, fue a partir de 1940 en sueros de humanos, aunque no existe un sistema confiable de casos. En 1965 eran endémicos 12 estados: Distrito Federal, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Querétaro, Michoacán, Oaxaca, Guerrero, Chiapas, Veracruz, San Luis Potosí y Nuevo León<sup>16</sup>. En 1985<sup>23</sup> se presentaron casos de Tifo Endémico y Tifo Murino, más tarde en 1999<sup>19</sup> se reportó la presencia de un caso aislado de Ehrlichiosis monocítica en Yucatán causado por *E. chaffeensis*. En el 2000<sup>24</sup>, Nuñez realizó un estudio nacional de seroprevalencia en perros sobre *E. canis* el agente causal de Ehrlichiosis monocítica canina, el cual iba tomando importancia debido al posible potencial zoonótico, reportado en el 2001 en Venezuela<sup>25</sup> donde se aisló esta bacteria por medio de un cultivo celular de un paciente sin manifestaciones clínicas, en el 2007 estudios regionales de seroprevalencia en el Noroeste de la República Mexicana reportaron una prevalencia de 34% en Mexicali, Baja California<sup>26</sup> y 74.6% en Sinaloa<sup>27</sup>. En el 2008, Sosa y colaboradores<sup>21</sup> reportaron la presencia de *A. phagocytophilum* en 152 perros de Sinaloa con una frecuencia de infección del 21%. Debido a la alta seroprevalencia de *E. canis* encontrada en ese estado del norte y el potencial zoonótico<sup>28,29</sup>. En el 2011 Sosa y colaboradores realizaron la búsqueda de los vectores transmisores y la presencia de la enfermedad en humanos mediante PCR y secuenciación con una prevalencia de infección de 29.1% para el gene para *Ehrlichia* spp y 22.3% para *E. canis*; reportando además las primeras evidencias clínicas de la enfermedad en humanos. A su vez no solo encontraron al vector competente de la bacteria; la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* si no a otros vectores hasta el momento potenciales positivos a *Ehrlichia* spp.

A inicios del 2009 se detectó en el municipio de Mexicali, Baja California un brote de Rickettsiosis causado por *Rickettsia rickettsii* principalmente y solo 3 casos de *R. prowasekii*; en la cual se estudiaron 1453 casos sospechosos, 734 casos probables y 278 casos confirmados mediante la técnica de PCR. Este brote

presentó una letalidad de 2.5%, donde las manifestaciones clínicas principales fueron: fiebre, cefalea, astenia, náuseas, vómito y dolor abdominal<sup>16</sup> (Figura 2).

Figura 2. Mapa de distribución de casos humanos de TBRD en México. Modificado de CENAPRECE 2012, Sosa *et al*, 2011 y Mercado, 2010.



## 2.2 Epidemiología del vector

Las garrapatas son artrópodos hematófagos que parasitan toda clase de vertebrados en casi todas las regiones del mundo<sup>12</sup> y han sido reconocidas como ectoparásitos de humanos desde hace cientos de años en la Grecia antigua por escritores como Homero o Aristóteles<sup>13</sup>. Desde los comienzos del siglo XX, las garrapatas han sido implicadas como vectores, reservorios y/o amplificadores de algunas enfermedades Rickettsiales zoonóticas. Hasta enero de 2008, se tienen 869 especies de garrapatas. Existen dos familias de garrapatas: Las Ixodidae o “garrapatas duras”, llamadas así debido a que en su dorso tienen un escudo esclerotizado y son la familia más importante en términos numéricos y médicos, y la familia Argasidae o “garrapatas blandas”, llamadas así porque carecen de escudo en su dorso y tienen una cutícula flexible. Las garrapatas tienen tres estadios de desarrollo en su ciclo de vida: larva, ninfa y adulto (macho y hembra)<sup>2,12</sup>.

Las garrapatas de la familia *Ixodidae* se distribuyen en todo el mundo, incluyendo las zonas antárticas, pero encontradas fácilmente en las regiones tropicales y

subtropicales. Son ectoparásitos obligados preferentemente de vertebrados, siendo vulnerables los mamíferos, quienes por su temperatura, olor y fuente de nutrientes son altamente atractivos<sup>2</sup>. Sin embargo, también son susceptibles de ser parasitadas aves, reptiles y anfibios. Estas garrapatas tienen varios atributos que mejoran su estatus de vector, puesto que se alimentan por largos periodos durante el cual permanecen en su huésped y su mordedura al alimentarse es indolora y así pasar desapercibidas; como ellas se alimentan solo una vez en cada estadio de desarrollo, pueden ocupar una gran variedad de posibles huéspedes en diferentes hábitats<sup>15</sup>.

A pesar de que las garrapatas se han estudiado por mucho tiempo, solo hasta finales del siglo XIX se logró demostrar que ellas pueden transmitir enfermedades; Smith y Kilbourne demostraron que la garrapata *Boophilus annulatus* transmitía al protozooario *B. bigemina*. Al comienzo del siglo XX, las garrapatas fueron implicadas ya como vectores de enfermedades bacterianas a los humanos. Como la garrapata *Ornithodoros moubata* (Argasidae), que en 1905 fue descrita como uno de los vectores de *Borrelia duttonii*, y 1906 la garrapata *Dermacentor andersoni* transmitía *R. rickettsi* por Ricketts<sup>2</sup>.

La principal importancia de las garrapatas es que son reservorios y vectores de una amplia gama de agentes patógenos causantes de varias enfermedades: virus (encefalitis), bacterias: rickettsias (fiebre Q, fiebre de las montañas rocosas, ehrlichiosis o anaplasmosis), *Francisella tularensis* (tularemia), *B. burgdorferi* (enfermedad de Lyme)<sup>8</sup>, protozoarios (babesiosis), los cuales son transmitidos a los vertebrados durante la alimentación o indirectamente por contacto con los fluidos de las glándulas coxales y heces<sup>5</sup>. En las últimas décadas, se ha incrementado el interés del estudio de las garrapatas Ixodidae por la transmisión de TBRD, las cuales son zoonosis emergentes en Europa y Estados Unidos solo después de la enfermedad de Lyme<sup>3</sup>.

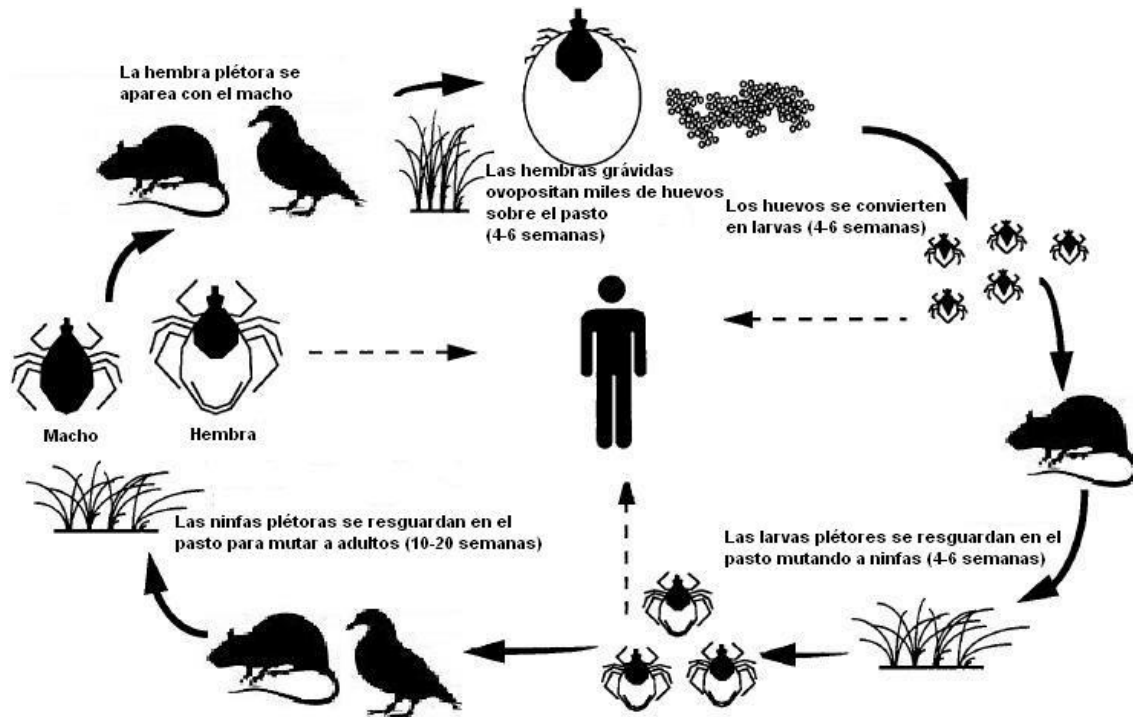
*Dermacentor variabilis* se encuentra distribuída en el este de las montañas Rocosas, así como en la costa del Pacífico. En México se ha reportado en Chiapas, Hidalgo, Edo. de México, Oaxaca, Puebla, San Luís Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Yucatán. El huésped predilecto para los adultos es el

perro, pero se alimenta indistintamente de grandes mamíferos<sup>4</sup>. Parasitan con frecuencia a humanos que realizan actividades al aire libre. Recientemente se demostró de manera experimental que la garrapata *D. variabilis*, en estado de ninfa es capaz de transmitir *E. canis*<sup>12</sup>. *Hemaphysalis leporis-palustris* es un parásito de conejos tanto silvestres como domésticos. Es el principal reservorio de la tularemia en Alaska. Se tienen datos de distribución que hacen suponer que se encuentra prácticamente por todo el país<sup>4</sup>. *Ixodes scapularis* la reportan para los Estados de Tamaulipas, Jalisco, Coahuila y Oaxaca<sup>8,13</sup> sobre perros, ganado y *Felis pardalis*. Es el principal vector de *B. burgdorferi* agente etiológico de la enfermedad de Lyme en México<sup>8</sup>. *Amblyomma americanum* sirve como vector biológico para la transmisión de *E. chaffeensis* y *E. ewingii*<sup>1</sup>.

**2.3 Ciclo de vida y ecología del vector.** Las garrapatas *Ixodidae* tienen 3 estadios de vida y una hospedero por estadio del cual se alimenta (larva, ninfa y adulto macho o hembra). En cada fase la garrapata busca un hospedero, se fija y alimenta durante periodos varios días. Una vez plétora, se separa de su huésped y cae para buscar un lugar donde pueda digerir la sangre, cambiar su muda a la próxima fase y buscar un nuevo hospedero o entrar en diapausa, un estado caracterizado por reducir el metabolismo y retrasar el desarrollo (Figura 2). La reproducción generalmente ocurre sobre el huésped<sup>2</sup>. Después la hembra cae de su hospedero para digerir la sangre y poner sus huevos (400 a más de 3,000 dependiendo de la especie) en un lugar seguro y muere. Su ciclo de vida está completo entre 2 meses a 2 años, pero pudiera tomar entre 6 meses a 6 años, dependiendo de las condiciones medioambientales; incluyendo temperatura, humedad relativa y fotoperiodo<sup>1</sup>. Las garrapatas pasan más del 90% de su vida libre y solo el 10% sobre su huésped. Muchas especies de garrapatas son exofílicas (ellas viven en campo abierto, prados o bosques)<sup>2</sup>. Adquieren una actividad estacional, buscando aun huésped potencial cuando las condiciones sean apropiadas. Ellas son muy sensibles al estímulo que indica la presencia del huésped, estos incluyen estimulaciones químicas, humedad, químicos aromáticos,

vibraciones y la temperatura corporal asociada con el calor de la sangre de animal<sup>2</sup>.

Figura 3. Ciclo de vida de la garrapata. Modificado de Parola y Raoult 2001.



Un número importante de garrapatas tienen un huésped en específico, alimentándose de una variedad limitada de animales. Otras garrapatas pueden alimentarse de un huésped diferente en cada estadio de su vida. Por ejemplo, la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* se alimenta en cada estadio de su vida solo de los perros<sup>32</sup>. Por otro lado, *Ixodes scapularis* y *Amblyomma americanum* se alimentan de diferentes especies animales, que pueden ser grandes mamíferos, hasta roedores o aves. Generalmente la distribución del hábitat también influye en la selección del huésped, porque las garrapatas se adaptan al hábitat o la vegetación. Diferentes especies de garrapatas tienen afinidad a alimentarse de los humanos. Un ejemplo de ello es la garrapata *R. sanguineus* que puede alimentarse del humano cuando no existe la presencia de su huésped el perro u otro posible hospedero<sup>2</sup>.

Durante las primeras 24 a 36 horas de fijación, no hay o es muy poca la ingestión de sangre, debido a que la penetración y fijación son las actividades predominantes. La secreción salivar producida por la garrapata tiene un cemento

para anclar el gnatosoma a la piel del huésped, enzimas, vasodilatadores, antiinflamatorios, antihemostáticos y sustancias inmunosupresoras, además de contener un anestésico que facilita la mordida. Aunque pudieran existir algunas especies que además contengan sustancias que provoquen la parálisis de sus huéspedes<sup>45</sup>.

**2.3.1 Epidemiología de las enfermedades transmitidas por garrapatas.** Las garrapatas pueden infectarse de la bacteria a través de tres vías: la alimentación de un huésped con bacteriemia, transestadial y transovárica. Todas estas formas de transmisión pueden ocurrir para una sola bacteria, como es el caso de *R. rickettsii* que puede ser transmitida de cualquiera de estas vías<sup>2</sup>.

Lo que mantiene a las enfermedades transmitidas por garrapatas en la naturaleza además de sus vector, son sus reservorios tanto animales domésticos como salvajes y ocasionalmente los humanos. Por cada enfermedad bacteriana, existen una o varias garrapatas vectores y además existir uno o más reservorios<sup>1</sup>. El huésped animal susceptible a la bacteria necesita desarrollar una bacteriemia relativamente larga para ser un reservorio de la infección. La infectividad de los reservorios, la velocidad de infestación de la garrapata son variables que determinan la epidemiología de estas enfermedades, que son influenciadas por factores fisiológicos y ecológicos como: la preferencia por el huésped en los diferentes estadios de la garrapata, el grado de contacto con la garrapata, la actividad temporal entre los vectores y el huésped, susceptibilidad del huésped a la bacteria, condiciones medio ambientales y la inmunidad del huésped. La proporción en que las garrapatas adquieran la bacteria se incrementa con la duración de la fijación sobre el reservorio mientras estas se alimentan<sup>2</sup>. La garrapata transmite la bacteria a los humanos cuando estas se están alimentando y los sitios están contaminados con secreciones salivares, regurgitación del contenido intestinal y heces. Las garrapatas sobre los humanos pueden colocarse en diferentes sitios pero los más frecuentes son en la cabeza, cuello e ingle. La garrapata *Dermacentor variabilis* vector de *R. rickettsii* se encuentra comúnmente en cabeza y cuello, *Amblyomma americanum* en extremidades, espalda baja e

íngles<sup>33</sup>, *Rhipicephalus sanguineus* en la cabeza de niños y en adultos en cualquier área del cuerpo e *Ixodes scapularis* en diferentes sitios<sup>15</sup>. Las razones por las cuales algunas garrapatas tienen sitios preferenciales para alimentarse aún no han sido descritas. Los factores de la garrapata relacionados con la velocidad en que se infectan los humanos con estas bacterias incluye: la prevalencia del vector, velocidad de infección, la posibilidad de alimentarse de las personas y la presencia de los reservorios.

Las enfermedades transmitidas por garrapatas tienen una distribución geográfica localizada y solo pueden existir en lugares que permitan una óptima condición para las garrapatas, sus huéspedes y las bacterias. Existe una serie de eventos que pueden perturbar estas asociaciones como los cambios climáticos, urbanización y deforestación. Para permitir el mantenimiento de la infección en nuevas áreas las garrapatas o los reservorios deben encontrar a otros reservorios o garrapatas. La dispersión de las garrapatas en grandes distancias se debe a que las garrapatas fijadas en sus huéspedes pueden viajar grandes recorridos en aves migratorias y mamíferos, pero además el hombre contribuye a la dispersión de éstas debido a las prácticas de agricultura o la modificación de los hábitats de las garrapatas para uso ganadero<sup>34</sup>.

Algunas garrapatas son capaces de transmitir varias bacterias. *I. scapularis* en EUA es el vector de *B. burgdorferi* sensu stricto, *A. phagocytophilum* y posiblemente *B. microti* un protozoario causante de la babesiosis. Además, una sola garrapata puede estar infectada de estos tres organismos<sup>2, 35</sup>. En Suiza se encontró en un 2% de las garrapatas *I. ricinus* la coinfección entre *B. burgdorferi* y *A. phagocytophilum*, y en Nueva York un 5.5% de coinfección de estas bacterias<sup>35</sup>. Se ha documentado la infección con *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* y *B. microti* en personas que han mostrado manifestaciones de casos atípicos de las enfermedades<sup>35</sup>.

## **2.4 Manifestaciones clínicas**

Una historia médica detallada puede revelar alguna actividad que sugiere una exposición potencial a la garrapata. Ya sea actividades al aire libre durante abril –

septiembre, particularmente en áreas donde el pasto sea alto o arbusto que puedan incrementar el riesgo de exposición a la mordedura de la garrapata; como actividades recreativas u ocupacionales que implicaran exposición al hábitat de la garrapata, estas actividades pueden incluir el campismo, excursionismo, pesca, jardinería y pasear a los perros; la vegetación que rodea las carreteras, vías férreas, y campos puede ser también hábitats para las garrapatas, viajes recientes a áreas donde TBRD pueda ser endémico o algún miembro de familia, compañero de trabajo o mascotas con una enfermedad similar puede proveer de información importante para hacer el diagnóstico presuntivo de TBRD. Sin embargo, la falta de algunos de estos hallazgos no excluye a este diagnóstico. En áreas endémicas donde los agentes causales de TBRD están presentes todo el año, adultos o niños que juegan sobre el pasto en sus propios patios son áreas de riesgo. La mayoría de los pacientes no recuerda o reconoce si fué mordido por la garrapata por que la localización de la garrapata es desconocida; la mordedura es un poco dolorosa, sobre todo si muerden en los estados inmaduros como las ninfas pero aun así puede transmitir la infección. Una historia específica de mordedura de garrapata se ha reportado en el 60% de los casos para Rickettsiosis y solo en un 68% en los casos de ehrlichiosis<sup>1,2,3</sup>.

Los médicos clínicos provenientes de áreas donde estas enfermedades tienen una baja incidencia o se desconoce su presencia están en desventaja debido a que no pueden distinguir esta de algunas otras enfermedades infecciosas y síndromes no infecciosos. Porque TBRD típicamente es esporádico, y la identificación de estas infecciones requieren de un muy buen historial clínico, especialmente si está en una zona en la cual TBRD no ha sido reconocida como ocurre frecuentemente<sup>36</sup>.

Las manifestaciones clínicas de TBRD son similares, y aparecen dos semanas después de la mordedura de la garrapata. La mayoría de los pacientes visitan al médico los primeros dos o cuatro días después de presentar alguna manifestación clínica. Las manifestaciones clínicas en un inicio se caracterizan por picos de fiebre, escalofríos y dolor de cabeza, comúnmente asociada con mialgia. Los adultos pueden presentar fotofobia. El dolor de cabeza siempre se reporta en los adultos y puede llegar a ser grave. Los pacientes también pueden presentar



nauseas, vómitos y anorexia al principio de la enfermedad, especialmente en Rickettsiosis y HME en niños. Pueden presentar diarrea. Otras manifestaciones observadas frecuentemente en los niños es el dolor abdominal, alteración del estatus mental y secreciones conjuntivales. El dolor abdominal grave pudiera parecer apendicitis o alguna otra causa de dolor abdominal agudo. Existen algunos reportes en los que se describen edema periorbital bilateral, edema en dorso, manos y pies, dolor en tendones de las pantorrillas<sup>35,37,38,39</sup>.

El 50% de los pacientes con TBRD requiere hospitalización, debido a que las manifestaciones pueden tornarse graves e incluye una fiebre prolongada, falla renal, confusión mental, tos, infiltrado en las radiografías torácicas, miocarditis, hipotensión, cuagulopatía diseminada intravascular, síndrome hemofagocítico, meningoencefalitis, síndrome de estrés respiratorio y fallas de múltiples órganos, rabdomiolisi, manifestaciones neurológicas (polineuropatías desmielinizantes) resultantes de la afectación de diversos sistemas orgánicos. La Anaplasmosis no ha sido asociada a la meningoencefalitis<sup>37,38,47,51</sup>.

Cuadro 2. Manifestaciones clínicas de TBRD. Tomado de Dumler *et al.*, 2007; Mercado, 2010 y Sosa *et al.*, 2011.

<i>M. clínicas</i>	<i>HME (%)</i>	<i>HGA (%)</i>	<i>SFRM (%)</i>	<i>CME (%)</i>
Fiebre	97	93	100	98
Mialgia	57	77	81	56
Cefalea	80	76	87	81
Nausea	64	38	66	56
Vómito	33	26	54	23
Diarrea	23	16	NA	2
Tos	26	19	35-80	16
Artralgia	41	46	72	25
Rash	31	11	98	NA
Tortícolis	3	21	53	NA
Confusión	19	17	68	NA
Escalofríos	56	82	60-82	54
Dolor abdominal	88	NA	86	NA

NA. No aplica.

Estas manifestaciones se han observado en pacientes del Continente Americano y Europeo por diferentes cepas, sugiere que depende más bien del estado fisiológico del paciente<sup>51</sup>. Los factores que influyen en la gravedad de estas enfermedades son: edad, sexo, abuso crónico del alcohol, deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, estado nutricional, una variedad de trastornos

relacionados con enfermedades inductoras de inmunodeficiencia como cáncer y otras enfermedades infecciosas como puede ser VIH<sup>40</sup>, alteraciones metabólicas, trasplante de órganos, esplenectomía, trastornos laborales, psíquicos o de estrés, que ocasionan un déficit secundario de la inmunocompetencia, además de enfermedades infecciosas oportunistas (neumonía micótica como candidiasis diseminadas, aspergilosis pulmonares, esofagitis necrotizantes y criptococcosis), que pueden llevar a la muerte del paciente <sup>10,51</sup>. En pacientes jóvenes sin otras patologías se observa inmunosupresión inducida por la propia enfermedad (neutropenia, trombocitopenia y linfopenia) no es, por si misma, tan intensa como para dejar al paciente desprotegido, pero puede potenciar estados de inmunodepresión subyacentes facilitando la infección por los patógenos oportunistas antes señalados<sup>51</sup>. Los pacientes que presentan una enfermedad de curso crónico o persistente (más de un año) presentan parálisis parcial de las extremidades, gangrena que requiere amputación de dedos, pies, brazos o piernas, existe también pérdida auditiva, ceguera, pérdida de la motilidad intestinal y control de los esfínteres; perdidas en el movimiento, y problemas en el habla. Estas complicaciones son observadas en los pacientes que se recuperaron de la enfermedad de curso grave después de la hospitalización<sup>33,38,39,51</sup>.

La letalidad de la Rickettsiosis puede elevarse hasta en un 25% de los casos cuando estos no han sido tratados y en 5% cuando fueron tratados. En los Estados Unidos se designó como enfermedades de notificación obligatoria en 1998<sup>17</sup>.

## **2.5 Métodos diagnósticos**

Existen muchos métodos disponibles para el diagnóstico de TBRD. Sin embargo cada uno requiere un tiempo para obtener los resultados y el tipo de información que el médico necesita, es por eso la necesidad en la formulación de nuevas técnicas más sensibles, específicas y rápidas. Sin embargo, la decisión para administrar el tratamiento debe estar basado en indicadores epidemiológicos y sospecha clínica para iniciar tratamiento<sup>36,41,42</sup>.

Un diagnóstico específico de TBRD puede ser mediante la visualización de la mórula dentro de la célula diana después de haber sido teñida por tinción Wright o Giemsa del frotis sanguíneo o capa flagística<sup>8</sup>. También por el aislamiento de las bacterias por cultivo celular y la detección de DNA de la bacteria con métodos moleculares<sup>23</sup>.

El diagnóstico confirmatorio de las TBRD está basado en la utilización de técnicas serológicas, pruebas que no están disponibles de manera rutinaria, a excepción de la Inmunofluorescencia indirecta que ha sido una herramienta básica en el diagnóstico, sin embargo tiene las siguientes desventajas:

- Tiene una respuesta inespecífica. La respuesta de anticuerpos puede haber reacción cruzada entre las diferentes especies de *Ehrlichia* como: *E. ewingii*, *E. muri* o *E. chaffeensis* y *E. canis*<sup>45</sup>.
- Retraso de la seroconversión debido a que una muestra tomada en la etapa temprana daría un resultado negativo y es necesario realizar muestras pareadas.
- Detecta solo el género de la bacteria (*Anaplasma/Ehrlichia*).

**2.5.1 Frotis sanguíneo.** El frotis se tiñe con tinción de Wright para lograr ver las inclusiones citoplasmáticas llamadas “mórulas”, la cuales pueden ser vistas como inclusiones punteadas en las células dianas. Es el diagnóstico más rápido y puede ser utilizado después de la aparición de la enfermedad. Esta técnica es poco sensible ya que el 10% de los pacientes infectados tendrán las mórulas. Algunos autores reportan una sensibilidad del 25 al 75%<sup>27</sup>.

**2.5.2 Diagnóstico molecular por PCR.** Dada la complejidad del diagnóstico serológico y la baja sensibilidad de estas pruebas, en pacientes con manifestaciones agudas, así como cuando estos presentan signos y síntomas inespecíficos pero con antecedentes de exposición a zonas endémicas, el diagnóstico clínico se hace en base a la seroconversión retrospectiva o el análisis de PCR<sup>42</sup> el cual es, actualmente uno de los criterios de diagnóstico de los CDC<sup>28</sup>. La PCR se realiza utilizando sangre con EDTA y extrayendo el DNA. Esta se está convirtiendo rápidamente en la técnica de mejor opción debido a que se necesita

muy poco tiempo después de la infección para lograr tener un resultado positivo. La PCR tiene una sensibilidad alta, donde se reportan rangos de sensibilidad entre el 85 al 95%<sup>42,48</sup>.

La amplificación de DNA específico mediante PCR y la posterior secuenciación son métodos rápidos y sensible para detectar la infección por TBRD e incluyen muestras de sangre, biopsias de piel y garrapatas<sup>2,48</sup>.

**2.5.3 Análisis de DNA por secuenciación.** Es una técnica desarrollada y diseñada para identificar genes o fragmentos amplificados. Es un marcador molecular de aplicación en epidemiología global o a largo plazo, aunque ocasionalmente utilizado para dar respuesta a interrogantes planteados en epidemiología local o a corto plazo (caracterización de brotes, diferenciación de recidivas, reinfecciones y/o fallos terapéuticos)<sup>43</sup>. El genoma completo de *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp; revela un alto grado de sintenia en los miembros del grupo. Pero la caracterización molecular en algunos miembros es altamente inmunoreactiva de cada especie que indica que algunas especies son substancialmente diversas (*E. chaffeensis*) y otras altamente conservadas (*E. canis*)<sup>44,48</sup>.

Desde el comienzo de 1980's, se han descrito más de 15 nuevas especies de bacterias que se transmiten por garrapatas en el mundo. Existen diferentes factores que pueden explicar el incremento de este número de enfermedades ó el incremento de su incidencia. Desde el punto de vista de Salud pública, el panorama global de las TBRD, está asociadas al subdesarrollo económico y cultural, y presentan elevadas incidencias en zonas con sub-urbanización vulnerable, además las personas están realizando cada vez más actividades al aire libre, lo cual incrementa el contacto con las garrapatas y estos patógenos. El entender los posibles factores que afectan a las enfermedades emergentes y/o reemergentes, es uno de los mayores retos para su estudio, afectando de una manera particular a la sociedad. Aunque se han estudiado por mucho tiempo, aún existe un gran desconocimiento en como hacerles frente, ya que se atribuye un método simplista y discontinuo en el abordaje del problema, excluyendo el

contexto social y ecológico que lo reduce a una respuesta lineal del patógeno en los cambios propios del medioambiente. Un punto de vista real de las enfermedades emergentes, requiere una perspectiva que incorpore una dimensión que afecta tanto en lo social como en lo físico, químico, y biológico. La noción de esta biocomplejidad enriquecerá a su estudio, y lo más importante, el sistema de interacción entre el humano, reservorios y el medioambiente. En este tenor, en el presente escrito se muestran sólidas evidencias que enfatizan la importancia del estudio de las enfermedades Rickettsiales transmitidas por garrapatas; demostrando nuevas herramientas de diagnóstico, diferencias filogenéticas, frecuencia y distribución; además, en una cadena de transmisión lógica la afección en el humano como huésped accidental. Y finalmente, como estos patógenos se verán influenciados por el cambio climático en su distribución y posterior afección a sus vectores y reservorios competentes.

### III. Development of multiplex PCR for detection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis*

**Carolina G. Sosa-Gutiérrez\*, Nicole L. Mendell, Donald Bouyer**

1. Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de  
Mexico. Mexico City, Mexico.

2. Department of Pathology. University of Texas Medical Branch, Galveston,  
Texas, US.

\*Corresponding author.

Carolina G. Sosa-Gutiérrez. Barranquilla 26. Lindavista. Gustavo A. Madero.  
07300. Mexico City, Mexico. Phone +51 (55) 17 8080-62. E-mail.  
[mcarososagtz@yahoo.com.mx](mailto:mcarososagtz@yahoo.com.mx).

*American Journal of Animal Science, In Submitting.*

## Resumen

Las especies de *Ehrlichia* son bacterias transmitidas por garrapatas, las cuales pueden causar un serio problema de gran importancia en la salud humana y animal. El ensayo se desarrolló una PCR multiplex utilizando el gene *GroEL*, para la detección de *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis*, con amplicones de 500 y 300 pb, respectivamente. La sensibilidad fue determinada en 16 a 24 copias mediante diluciones seriales de dos cantidades de plásmidos, el cual contenía el gene bacterial. La habilidad de amplificar en garrapatas, sangre y tejidos confirmó la eficacia de la reacción.

**Palabras claves:** Desarrollo; PCR multiplex; *GroEL*; *Ehrlichia chaffeensis*; *Ehrlichia canis*.

## Abstract

A multiplex PCR was developed for detection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis*. *Ehrlichia* species are tick-borne bacteria, which can cause serious diseases relevant to animal and human health. The assay developed utilized the *GroEL* gene and amplified a 500 and 300 bp amplicon to *E. canis* and *E. chaffeensis*, respectively. The sensitivity was determined to be 16 – 24 copies per reaction by serial dilutions of two quantitated plasmids, which contained each bacterial gene. The ability to amplify tick, blood and tissue positive samples confirmed the efficacy of the reaction.

**Keywords:** Development; multiplex PCR; *GroEL*; *Ehrlichia chaffeensis*; *Ehrlichia canis*.

**Introducción.** Las especies de *Ehrlichia* son bacterias intracelulares obligadas transmitidas por garrapatas, las cuales son una importante causa de enfermedades infecciosas emergentes para el hombre y animales (1,2). Estos patógenos se mantienen en un ciclo que incluye garrapatas duras, animales domésticos y silvestres, siendo el hombre un huésped accidental (3). *Ehrlichia chaffeensis* y *E. canis* son bacterias que pueden causar enfermedad tanto en humanos como en animales. Con la aplicación de métodos moleculares, nuevas especies o cepas han sido detectadas en sangre de mamíferos, garrapatas y otros tejidos alrededor del mundo (4). *E. chaffeensis* es el agente causal de la Ehrlichiosis monocítica humana (HME), y *Ehrlichia canis* es agente causal de Ehrlichiosis monocítica canina (EMC), ambos infectando los monocitos (1). HME se caracteriza por fiebre, malestar general, cefalea y mialgia (5). EMC se caracteriza por fiebre, anorexia, depresión, letargia, esplenomegalia y pérdida de peso (6).

El diagnóstico de HME y EMC, comúnmente se lleva a cabo mediante técnicas serológicas (Inmunofluorescencia indirecta, IFA). Sin embargo, esta técnica se limita a la capacidad de detectar anticuerpos, y usualmente la producción de ellos en los pacientes se limita al séptimo día en la etapa aguda de la enfermedad (7,8). La ausencia de anticuerpos puede influenciar en la decisión del diagnóstico, y contribuir a un resultado fatal (9). La prueba de PCR ha demostrado ser sensible y específica para la detección de *E. chaffeensis* y *E. canis* en las muestras obtenidas de la práctica clínica y trabajo de campo (10,11,12). Ambas bacterias se encuentran estrechamente relacionadas genéticamente, lo cual implica realizar al menos dos reacciones de PCR para su detección, implicando un aumento en los costos y el tiempo (11,12).

Es necesario un diagnóstico rápido y apropiado para administrar un tratamiento altamente específico. Aquí, describimos el desarrollo de una PCR multiplex con alta sensibilidad y especificidad para la detección de *E. chaffeensis* y *E. canis* en la misma reacción mediante la amplificación del gene *GroEL*.



**Material y Métodos.** El experimento se llevo a cabo en el Laboratorio de Rickettsiología de la University of Texas Medical Branch, en Galveston, Texas. Para realizar este ensayo se utilizaron las bacterias de *E. chaffeensis* cepa Arkansas y *E. canis* cepa Jake, las cuales se cultivaron en la línea celular DH82. El DNA fue extraído del cultivo celular utilizando el kit QIAamp DNA Blood and tissue (Qiagen Inc, Valencia, CA) acorde a las instrucciones de manufactura. Los iniciadores fueron diseñados con el software PrimerSelect v.11.2.1(IDT, Coralville, IA) (cuadro 1), los cuales amplificaron un producto de 500 y 300pb para *E. canis* y *E. chaffeensis*, respectivamente.

Cuadro 1. Iniciadores utilizados para la reacción de PCR multiplex.

Nombre	Secuencia 5´-3´	Tamaño
EcanGroel-F	AGC GCT TCA CCT TCT ACA TC	500pb
EchaGroel-F	AGT TAG ATC TTC CAT TTT TAT TG	200pb
EspGroel-R	ATT GGC TCT TGC TAT TGC TAA	

La reacción de PCR fue llevada a cabo con un volumen de 20µl de 5-PRIME Master Mix (5PRIME, US), la concentración de los iniciadores fue de 100nM cada uno y 2 µl de la muestra. Se calculó una temperatura de alineamiento mediante un gradiente de 48-52°C. Las condiciones finales fueron: desnaturalización inicial de 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 48-52°C por 45 segundos y 74°C por 30 segundos, y la extensión final fue de 72°C por 7 minutos. Para la visualización del producto se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa a 1.5%, teñida con bromuro de etidio al 1%, y visualizando en un transiluminador de UV. Para determinar la especificidad, utilizamos DNA de otros microorganismos estrechamente relacionados con las especies de *Ehrlichia* (*Anaplasma phagocytophilum* cepa Webster, *Rickettsia rickettsii* cepa SheilaSmith, agente de *E. muris-like*, *R. conorii* cepa Malish 7, y *R. typhi* cepa Welmington). Para estar seguros de que no hubo amplificación inespecífica. Se utilizó agua como control negativo.

Además, se desafió a esta PCR multiplex, utilizando DNA positivo y negativo extraído de garrapatas, sangre y tejido, previamente confirmado mediante una reacción de PCR en tiempo real en un nuevo enzayo(8). Para determinar la

sensibilidad de la PCR, construimos plásmidos de controles positivos que contenían una sola copia de cada gene, utilizando TOPO TA Cloning Kit (INVITROGEN, CA), y One-Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (INVITROGEN, CA), la purificación del plásmido fue con el kit de Purificación (QIAGEN, CA). El plásmido fue cuantificado y seriado a 10- diluciones.

**Resultados.** La temperatura de alineamiento óptima determinada fue de 52°C, con una banda visualizada en la reacción con un solo patógeno y dos bandas en la reacción con ambos patógenos al peso esperado. La reacción de PCR multiplex mostró una alta especificidad, ya que solo DNA de *E. canis* y *E. chaffeensis* fue amplificado, mientras que en las demás reacciones no hubo amplificación cuando se realizó con los otros microorganismos. En las PCR multiplex con DNAs de garrapatas, sangre y tejidos donde se observó la amplificación en 12 muestras previamente conocidas de ser positivas mediante PCR en tiempo real. Los controles negativos fueron consistentemente negativos en todas las reacciones, así como el DNA que se conocía previamente como negativos. Encontramos una sensibilidad de 16 y 24 copias para detectar el gene *GroEL* de *E. canis* y *E. chaffeensis*, respectivamente (figura 1).

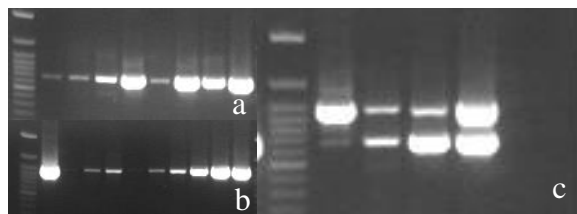


Figura 1. A) Prueba de sensibilidad para *E. canis*, B) prueba de sensibilidad para *E. chaffeensis* y C) prueba para ambas bacterias.

**Discusión.** HME y CME son enfermedades con un gran impacto en la salud humana y animal. Ambas son reportadas alrededor del mundo; y recientemente en México, provocando la muerte de una persona sin antecedentes de viajes (18). El aplicar un diagnóstico apropiado y tratamiento oportuno puede salvar vidas. Describimos una reacción de PCR multiplex capaz de detectar 16 a 24 copias por

reacción de *E. canis* y *E. chaffeensis*, respectivamente. Existen muchos métodos y genes diana para los microorganismos Rickettsiales empleando diferentes genes como el *dsd*, *16SrRNA*, *gltA* y *17kDa* (1,8,13,14,15). Este reporte muestra una PCR multiplex nueva, rápida y de bajo costo amplificando el gene *GroEL* como diana. El gene *GroEL* es conocido por ser sobre-expresado en muchas bacterias intracelulares, siendo mutualista y patogénico, aunque el mecanismo es impreciso, se conoce por estar implicado en la regulación génica más que en la duplicación (16). También, se considera como un gene apropiado para el análisis filogenético de las especies de *Ehrlichia* (17).

La reacción de PCR multiplex muestra una alta concordancia comparado con los métodos no multiplex antes descritos (1,8,10,11,13). Encontramos que el DNA extraído de garrapatas, sangre y tejidos no tuvo un efecto significativo sobre la especificidad de la reacción. La infección con múltiples patógenos transmitidos por garrapatas puede ocurrir en un solo individuo seguido de una fuerte exposición a garrapatas. Además, la misma especie de garrapata puede ser el vector de muchos patógenos, y la co-infección de una sola garrapata puede ocurrir.

**Conclusión.** Presentamos una reacción de PCR multiplex sensible, específica y de bajo costo para detectar dos especies de *Ehrlichia*. La amplificación del gene *GroEL* de *E. chaffeensis* y *E. canis* mediante PCR fue exitosa, utilizando los iniciadores específicos de especie. El protocolo que proponemos puede ser utilizado para detectar estas especies en muestras clínicas de sangre, así como muestras de garrapatas y tejidos.

**Agradecimientos.** Todos los autores quieren agradecer a David H. Walker, por la revisión del manuscrito. CGSG recibió una beca doctoral por CONACYT.

#### **Literatura citada**

1. Pinheiro RC, Henrique GMP, Reis T, Campos R, Figueira ADC, McCulloch JA, Conceicao MAM, Costa GE, 2013. Detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma*

*platys* DNA using multiplex PCR. Vector-borne and zoonotic diseases 13(12): 846-850.

2. Nicholson WL, Allen KE, McQuiston JH, Breitschwerdt EB, Little SE, 2010. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. Trends Parasitol 26(4): 205-212.

3. Dong J, Olano JP, McBride JW, Walker DH, 2008. Emerging pathogens and successes of molecular diagnostics. J Mol Diagn 10:185-197.

4. Sanogo YO, Parola P, Shpynov S, Camicas JL, Brouqui P, Caruso G, Raoult D, 2003. Genetic diversity of bacterial agents detected in ticks removed from asymptomatic patients in Northeastern Italy. Ann NY Acad Sci 990: 182-190.

5. Sehdev AE, Dumler JS, 2003. Hepatic pathology in human monocytic ehrlichiosis. *Ehrlichia chaffeensis* infection. Am J Pathol 119:859-865.

6. Harrus S, 2015. Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). Vet J 204: 239-240.

7. Stenos J, Graves SR, Unsworth NB, 2005. A highly sensitive and specific real-time PCR assay for the detection of spotted fever and typhus group Rickettsiae. Am J Trop Med Hyg 73(6): 1083-1085.

8. Doyle CK, Labruna MB, Breitschwerdt EB, Tang YW, Corstvet RE, Hegarty BC, Bloch KC, Li P, Walker DH, McBride JW, 2005. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. J Mol Diagn 7(4): 504-510.

9. Ismail N, Bloch KC, McBride JW, 2009. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. Clin Lab Med 30(1): 261-292.

10. Sosa-Gutierrez CG, Vargas M, Torres J, Gordillo-Perez MG, 2014. Tick-borne rickettsial pathogens in rodents from Mexico. J Biome Sci Eng 7(11): 884-889.

11. McBride JW, 2012. *Ehrlichia chaffeensis* TRP32 interacts with host cell targets that influence intracellular survival. Infect Immun 80(7): 2297-2306.

12. Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF, 2004. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. J Clin Microbiol 42 (7): 3164-3168.

13. Kidd L, Maggi R, Diniz PPVP, Hegarty B, Tucker M, Breitschwerdt E, 2008. Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of spotted fever group rickettsia in dog blood. *Vet Microbiol* 128: 294-303.
14. Denison AM, Amin BD, Nicholson WL, Paddock CD, 2014. Detection of *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, and *Rickettsia akari* in skin biopsy specimens using a multiplex real-time polymerase chain reaction assay. *Clin Infect Dis* 59:635-642.
15. Corales JMI, Vilorio VV, Venturina VM, Mingala CN, 2014. The prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs in Nueva Ecija, Philippines based on multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assay. *Ann Parasitol* 60(4): 267-272.
16. Wenergreen JJ, Moran AN, 1999. Evidence for genetic drift in endosymbionts (*Buchnera*): analyses of protein-coding genes. *Mol Biol Evol* 16(1): 83-97.
17. Xu XJ, Zhang XF, McBride JW, Zhang Y, Walker DH, 2001. Phylogenetic relationships of *Anaplasma marginale* and “*Ehrlichia platys*” to other *Ehrlichia* species determined by *GroEL* amino acid sequences. *Int J Syst Evo Microbiol* 51:1143-1146.
18. Sosa-Gutierrez CG, Solorzano-Santos F, Walker DH, Torres J, Gordillo-Perez MG. Fatal Ehrlichiosis monocytic in a 38 years-old mexican woman: a case study. *Emerg Infect Dis*. *In press*.

**IV. Primer análisis filogenético de *Ehrlichia canis* en perros y garrapatas de México (Estudio preliminar)**

**First phylogenetic analysis of *Ehrlichia canis* in dogs and ticks from Mexico  
(Preliminary study)**

**Molecular phylogenetic analysis in Mexico**

Carolina Sosa-Gutiérrez,<sup>1,2\*</sup> Margarita Vargas-Sandoval,<sup>3</sup> Ph.D, Ma, Teresa,  
Quintero-Martínez<sup>2</sup> Ph.D, Guadalupe Gordillo-Pérez,<sup>1</sup> Ph.D.

<sup>1</sup> Instituto Mexicano del Seguro Social. Centro Médico Nacional Siglo XXI. Hospital de Pediatría, Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Cuauhtémoc, Nro. 330, Col. Doctores. México D.F, México.

<sup>2</sup> Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ciudad Universitaria, S/N. México D.F, México.

<sup>3</sup> Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Agrobiología, Departamento de Entomología. Av. Lázaro Cárdenas S/N, Col. Revolución, C.P. 60150, Uruapan, Michoacán.

\*Correspondencia: Carolina G. Sosa-Gutiérrez; mcarososagtz@yahoo.com.mx.

*Revista MVZ Córdoba, In press.*

## Resumen

**Objetivos.** Caracterización filogenética de *Ehrlichia canis* en perros naturalmente infectados y sus garrapatas, mediante PCR y secuenciación del gene *16SrRNA*; así como compararlos con los diferentes aislados encontrados en el continente Americano. **Material y métodos.** Se colectaron muestras sanguíneas de 139 perros con manifestaciones clínicas sugestivas a esta enfermedad, y que estuvieran infestados con garrapatas. Una parte del gene *16SrRNA*, fue secuenciada y alineada junto con las 17 secuencias reportadas en los países del continente Americano. Se construyeron dos árboles filogenéticos utilizando el método de Máxima verosimilitud compuesta, y Máxima parsimonia. **Resultados.** Fueron positivos a *E. canis* 25/139 (18.0%) perros y 29/139 (20.9%) garrapatas colectadas sobre los perros. Las manifestaciones clínicas presentadas fueron fiebre, astenia, depresión y vómito. Las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor variabilis* y *Haemaphysalis leporis-palustris* fueron positivas a *E. canis*. El análisis filogenético mostró que las secuencias de perros y garrapatas de México forman un tercer grupo que diverge de las secuencias de Sudamérica y EUA. **Conclusiones.** Es el primer análisis filogenético de *E. canis* en México. Además, en México se tienen diferencias entre las secuencias encontradas en perros y garrapatas, y las reportadas en Sudamérica y EUA. Esta investigación sienta las bases para profundizar en el estudio de la variabilidad genética.

**Palabras clave:** Ehrlichiosis, secuenciación, *16SrRNA*, genética, etiología (Fuente: MeSH).

## Abstract

**Objectives.** Phylogenetic characterization of *Ehrlichia canis* in dogs naturally infected and ticks diagnosed by PCR and sequencing of *16SrRNA* gene; compare different isolates found in American countries. **Methods.** Were collected Blood samples from 139 dogs with suggestive clinical manifestations of this disease and they were infested with ticks; part of *16SrRNA* gene was sequenced and aligned, with 17 sequences reported in American countries. Two phylogenetic trees were constructed using the Maximum likelihood method, and Maximum parsimony. **Results.** They were positive to *E. canis* 25/139 (18.0%) dogs and 29/139 (20.9%) ticks. The clinical manifestations presented were fever, fatigue, depression and vomiting. *Rhipicephalus sanguineus* *Dermacentor variabilis* and *Haemaphysalis leporis-palustris* ticks were positive for *E. canis*. Phylogenetic analysis showed that the sequences of dogs and ticks in Mexico form a third group diverging of sequences from South America and USA. **Conclusions.** This is the first phylogenetic analysis of *E. canis* in Mexico. There are differences in the sequences of Mexico with those reported in South America and USA. This research lays the foundation for further study of genetic variability.

**Key words:** Ehrlichiosis, sequencing, *16SrRNA*, genetics, etiology (Source: MeSH).



## Introducción

*Ehrlichia canis* es una bacteria intracelular obligada, patógeno causal de la Ehrlichiosis Monocítica Canina (CME). Una enfermedad potencialmente zoonótica transmitidas por garrapata (1,2). Su vector es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*. La distribución de CME está estrechamente relacionada con la distribución del vector (3). En México, la seroprevalencia nacional en perros es de 33%, y 74.5% en el noroeste del país (4). Las manifestaciones clínicas en los perros infectados son: fiebre, vómito, artralgia, rash, y diarrea (5). Su diagnóstico se basa en la visualización de la mórula dentro del monocito e inmunoensayo-enzimático (4); sin embargo, las herramientas moleculares como la detección del gene *16SrRNA* mediante PCR y secuenciación han sido utilizadas exitosamente para el diagnóstico (6,7).

En Venezuela, se aisló *E. canis* de sangre en un paciente asintomático, años después en esa misma zona se encontró a una persona positiva, y con manifestaciones clínicas sugerentes a una Ehrlichiosis, proponiendo que esta bacteria es un patógeno zoonótico (2,8). Debido a la alta seroprevalencia de infección en perros y garrapatas en diferentes zonas de México, es necesario determinar la frecuencia real mediante técnicas moleculares, y conocer la variabilidad genética de *E. canis* en los perros infectados, y de las garrapatas reportadas en América. Acorde a esto, el objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de *Ehrlichia canis* en perros naturalmente infectados; así como, de las garrapatas que lo están infestando, comparar las secuencias identificadas en México con aquellas publicadas en el GenBank de países Americanos, y realizar un análisis filogenético buscando la relación entre los aislados.

## Material y Métodos

**Sitio de estudio y recolección de muestras.** La colecta de muestras se llevó a cabo en el Noroeste de México, en el estado de Sinaloa. El estudio fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación (R-2013-785-069; México). Las muestras fueron colectadas de Julio del 2010 hasta Agosto del 2011. Se incluyeron en el estudio los perros capturados por las perreras municipales de tres ciudades al Norte, Centro y Sur del estado, así como los perros llevados a revisión

a alguna de las clínicas veterinarias participantes. Se invitó a los dueños de los perros enfermos, trabajadores de las clínicas veterinarias y de las perreras a participar en el estudio, previo consentimiento informado; 88 personas aceptaron y se les tomó muestra sanguínea para la búsqueda de infección (no se muestran estos resultados). Se tomó muestra sanguínea a 139 perros con manifestaciones clínicas sugestivas, y que estuvieran infestados con garrapatas, colectándose dos garrapatas por cada perro. Las garrapatas fueron identificadas morfológicamente por entomólogos, mediante claves dicotómicas. El ADN de las muestras sanguíneas de los 139 perros y garrapatas fue extraído con el kit QIAamp® DNA Blood purificación (Qiagen, CA), y se congeló el ADN a -80°C, hasta su procesamiento. Para la detección de *E. canis* y *Ehrlichia* spp. se amplificó una parte del gene *16SrRNA*, utilizando los iniciadores ECC-ECB y HE3-ECA previamente descrito (2,8), amplificando una banda esperada de 389pb; y la secuenciación se realizó con los iniciadores 15F-842R previamente descritos, amplificando el gene *16SrRNA*, con una banda esperada de 400pb (9). En cada reacción se incluyó un control positivo y negativo (agua destilada).

**Secuenciación.** Las muestras positivas (*Ehrlichia canis*) fueron purificadas mediante QIAquick Gel Extraction Minikit (Qiagen, CA). Las secuencias fueron analizadas con el programa Chromas 233, y se realizó la búsqueda en base de datos de GenBank, para determinar la especie y homología.

**Análisis filogenético.** Fue secuenciada una parte del gene *16SrRNA*, y alineada de manera individual con el programa MUSCLE. Los árboles filogenéticos se construyeron con el programa MEGA v.5, utilizando el método de Máxima Verosimilitud Compuesta (MLC), y Máxima Parsimonia, mediante el ensamblaje de 1,000 datos en repeticiones aleatorizadas. El algoritmo del vecino más cercano fue utilizado para obtener el árbol inicial, con 10 réplicas de las secuencias (10,11).

## **Resultados**

De los 139 perros con sospecha clínica a Ehrlichiosis canina, se obtuvieron 41 perros positivos, de los cuales presentaron fiebre, astenia, depresión, vómito,

náuseas y petequias (Tabla 1). Para *Ehrlichia* spp., se encontró 41/139(27.52%) de los perros con sospecha clínica, donde *E. canis* fue detectada en 25/139 (18.0%).

Cuadro 1. Manifestaciones clínicas presentadas en perros con Ehrlichiosis.

Manifestación clínica	Perros con Ehrlichiosis (%)	Valor de P	OR, 95% CI
Fiebre	19 (61.0)	<0.01	8.04 (2.84-23.02)
Astenia	23 (74.2)	≤0.01	12.27 (4.18-37.28)
Depresión	6 (25.0)	<0.01	5.86 (1.95-16.86)
Vomito	13 (42.0)	<0.01	4.46 (1.55-13.00)
Nausea	13 (42.0)	<0.01	3.82 (1.40-10.56)
Petequia	9 (19.4)	<0.01	15 (2.05-140.00)*
Anorexia	12 (38.7)	NS	-
Epistaxis	1 (3.2)	NS	-*
Melena	2 (6.4)	NS	-*

\* Prueba exacta de Fisher. NS: No significativo.

La garrapata *R. sanguineus* fue la más prevalente (92.1%), además se identificaron las garrapatas *Ixodes scapularis*, *H. leporis-palustris* y *D. variabilis*. Fueron positivas a *Ehrlichia* spp. 32/139(23.2%) garrapatas, y 29/139(20.86) a *E. canis* (Tabla 2).

El riesgo de los perros de contraer la infección con *E. canis* cuando las garrapatas son positivas es de 8.24 OR (CI 3.2-21.9, 95%).

Cuadro 2. Identificación, estadio evolutivo y resultados de las garrapatas colectadas.

Identificación	No. garrapatas (%)	Estadios			Resultados	
		♂	♀	ninfas	<i>Ehrlichia</i> spp. (%)	<i>E. canis</i> (%)
<i>R. sanguineus</i>	128 (92.1)	44	58	26	29 (87.5)	28(93.1)
<i>D. variabilis</i>	6 (4.3)	0	6	0	2 (6.20)	1 (3.45)
<i>H. leporispalustris</i>	3 (2.1)	0	2	1	1 (3.15)	0
<i>I. scapularis</i>	1 (0.72)	0	1	0	0	0
<i>Boophilus</i> spp	1 (0.72)	1	0	0	0	0
Total	139	45	67	27	32	29

♂: Macho. ♀: Hembra.

De los productos positivos, se secuenciaron 6 muestras para *E. canis*; tres muestras de perros y tres muestras de garrapatas. Las secuencias amplificadas del gene *16SrRNA* de perros y garrapatas mostraron una identidad de 99.8%

(GenBank No. KP844657-62) a la secuencia de *Ehrlichia canis* cepa Jake, *E. canis* VHE, *E. canis* VDE, y *E. canis* cepa Brazil-COI (Tabla 3).

Se realizaron dos árboles: el primero con el método de Máxima verosimilitud (Figura 1), en cual muestra el árbol con la probabilidad de registro más alto (-1074.2304); se construyó de forma automática, con la búsqueda heurística mediante la aplicación del algoritmo de vecino más cercano con una matriz de distancias estimadas por pares, utilizando el método de MCL; después de seleccionar la topología con un valor de probabilidad log superior. El árbol se muestra a escala, con longitudes de rama medidos en el número de sustituciones por sitio.

El segundo árbol se construyó mediante el método de Máxima Parsimonia (Figura 2). Se muestra el mejor árbol de los 10 árboles más parsimoniosos (longitud=91). El índice de consistencia es 0.967033 (0.936170), el índice de retención es de 0.972973 (0.972973), y el índice compuesto es 0.940897 (0.910868) para todos los sitios y los sitios de parsimonia. El árbol se obtuvo utilizando el algoritmo subárbol-poda-reinjerto (SPR) con nivel de búsqueda 0 en el que los árboles iniciales se obtuvieron mediante la adición aleatoria de secuencias (10 repeticiones).

## **Discusión**

Estos resultados confirman la existencia del ciclo enzoótico de transmisión a *E. canis* en Sinaloa, México. El 92.1% de las garrapatas identificadas fueron *R. sanguineus*, de las cuales 28 fueron positivas a *Ehrlichia* spp., y 27 positivas a *E. canis*. Dos garrapatas *D. variabilis* adultas fueron infectadas con *Ehrlichia* spp. siendo el primer reporte de esta asociación en México, aunque ya está demostrado de manera experimental la competitividad de este vector a transmitir la bacteria (4). Los anticuerpos a *E. canis* pueden permanecer elevados durante un periodo de tiempo prologando, provocando falsos positivos en zonas endémicas.

Es la primera evidencia de *E. canis* en las garrapatas *H. leporis-palustris* en México. Lo que pudiera representar la presencia de vectores potenciales, capaces

de transmitir *E. canis*. Se necesita más información al respecto, para conocer si estos vectores pueden adquirir el papel de vectores competentes; es decir, capaces de transmitir este patógeno y causar la enfermedad.

La presencia de tres grupos principales (I, II y III) para *E. canis*, demuestra que este patógeno presenta pocas variables en el continente Americano, similar a lo encontrado en otros trabajos (6). Aunque los aislados mexicanos muestran diferencias entre los grupo I y II, las secuencias encontradas presentaron una relación ancestral con las secuencias de Venezuela, Brasil y Estados Unidos; hipotetizando que es posible encontrar la misma variante de *E. canis* entre los países de América.

Es necesario realizar el análisis filogenético de *E. canis* entre las secuencias presentes a nivel mundial, así como, la búsqueda de otros genes con mayor variabilidad, y observar el comportamiento.

Este estudio presenta las primeras evidencias moleculares de *E. canis* en perros y garrapatas de México. Los resultados muestran un alto riesgo de infección en perros infestados con garrapatas. La importancia de entender el ciclo enzoótico de *Ehrlichia* en garrapatas, reservorios silvestres y domésticos, puede ayudar a realizar estrategias para prevenir la infección en los perros (12). Esta investigación sienta las primeras bases para profundizar en el estudio de la variabilidad genética, aislados no solo de *E. canis*, sino del resto de las enfermedades transmitidas por vector, ayudando a entender el comportamiento, y posibles blancos en su prevención.

### **Agradecimientos**

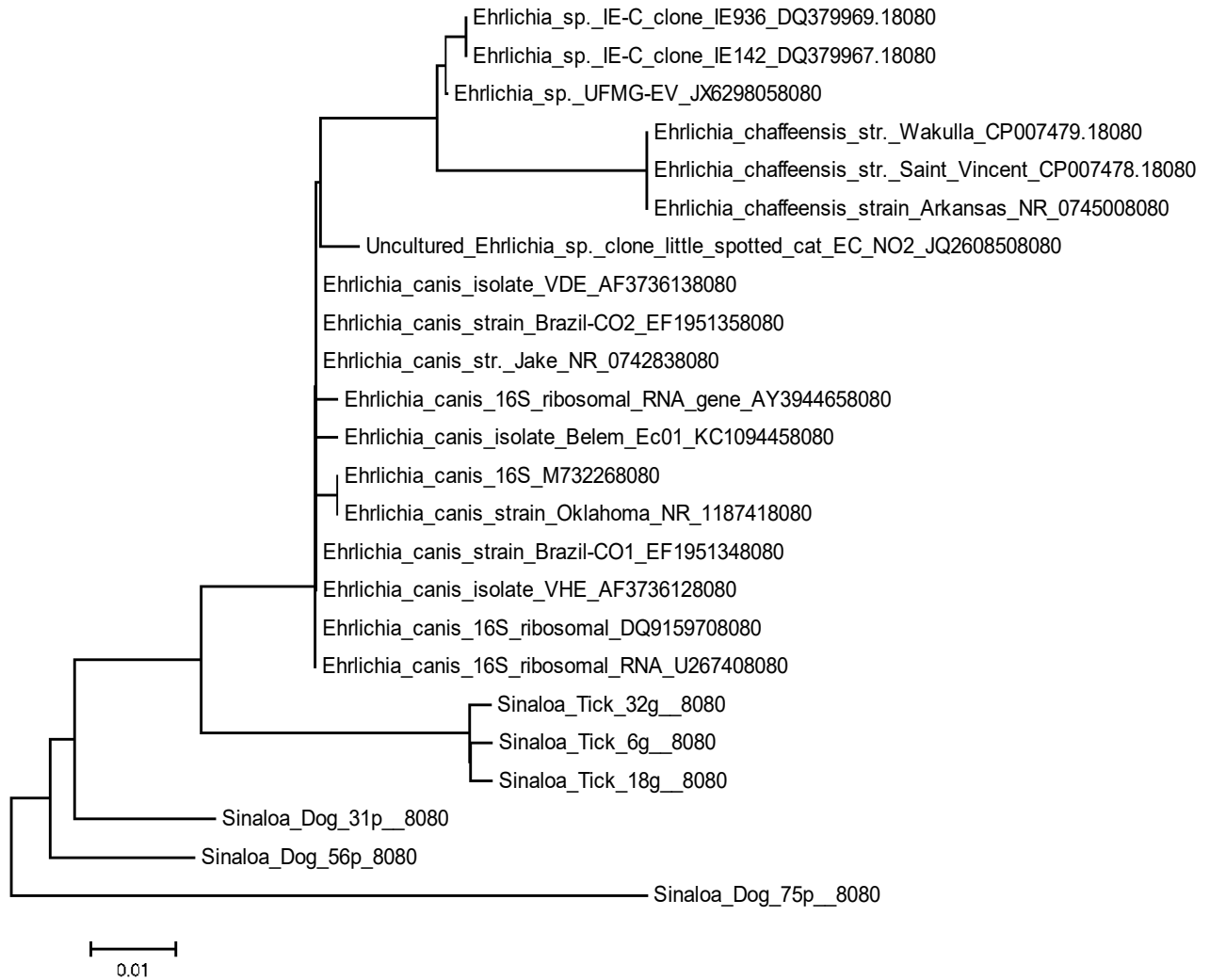
El proyecto fue financiado por: CONACYT-Salud 2008-1 87868 y una beca escolar otorgada por CONACYT: 252266.

Cuadro 3. Frecuencia de sustitución (%) entre los aislados de *Ehrlichia canis* de perros y garrapatas con los aislados encontrados en el continente Americano.

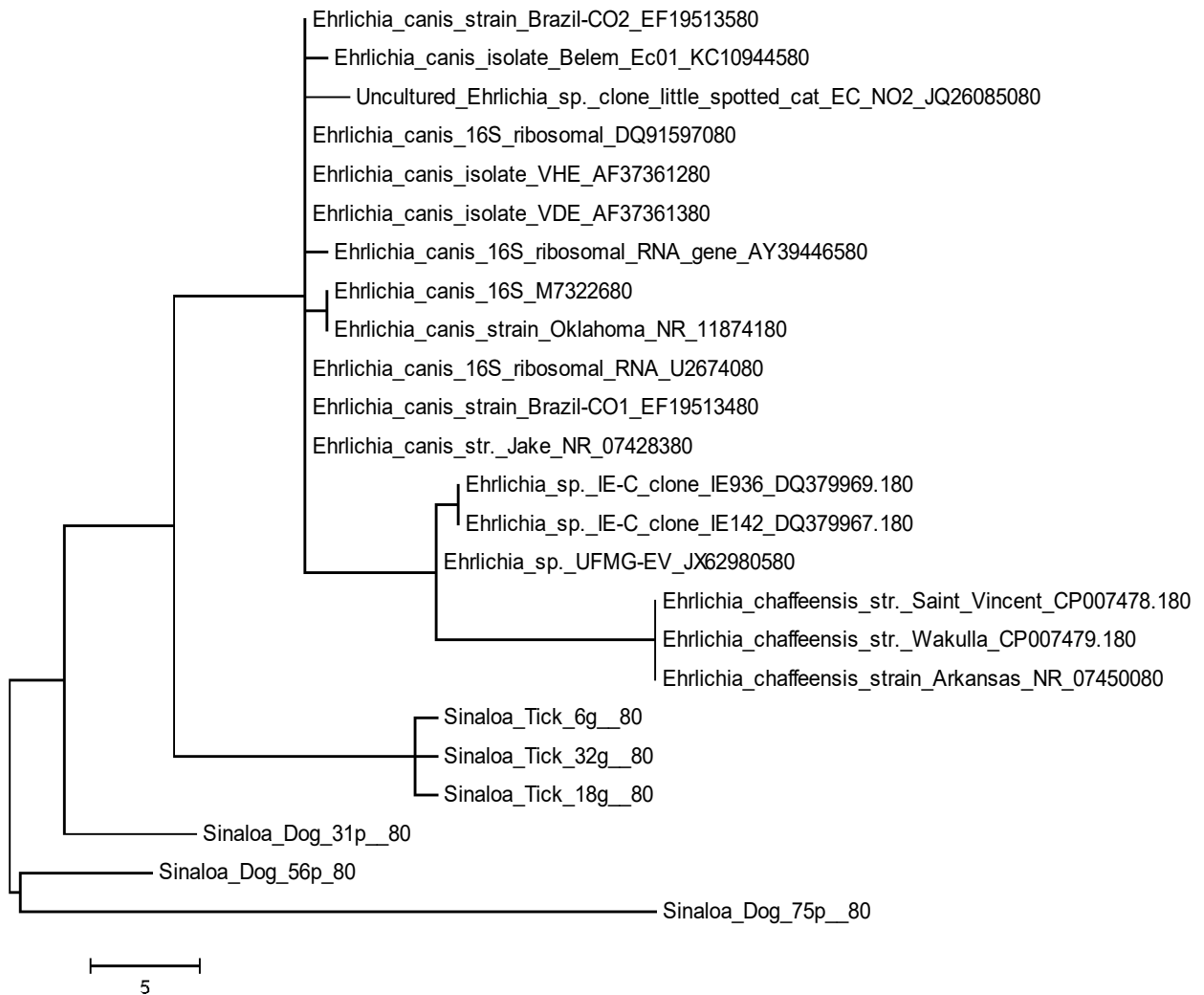
Secuencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>E. canis</i> str. Jake		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. canis</i> str. Brazil-CO2	0.000 0		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. canis</i> str. Brazil-CO1	0.000 0	0.000 0		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. canis</i> M7322680	0.002 5	0.002 5	0.002 5		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. canis</i> str. Oklahoma	0.002 5	0.002 5	0.002 5	0.000 0		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. canis</i> iso. VDE	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.002 5	0.002 5		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. canis</i> iso. VHE	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.002 5	0.002 5	0.000 0		-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. canis</i> DQ91597080	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.002 5	0.002 5	0.000 0	0.000 0		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. canis</i> iso. Belem_Ec01	0.002 5	0.002 5	0.002 5	0.005 0	0.005 0	0.002 5	0.002 5	0.002 5		-	-	-	-	-	-	-
<i>E. canis</i> U2674080	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.002 5	0.002 5	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.002 5		-	-	-	-	-	-
<i>E. canis</i> AY39446580	0.002 5	0.002 5	0.002 5	0.005 0	0.005 0	0.002 5	0.002 5	0.002 5	0.005 0	0.002 5		-	-	-	-	-
Sinaloa Tick6g	0.047 6	0.047 6	0.047 6	0.050 3	0.050 3	0.047 6	0.047 6	0.047 6	0.050 3	0.047 6	0.050 4		-	-	-	-
Sinaloa Tick32g	0.047 6	0.047 6	0.047 6	0.050 3	0.050 3	0.047 6	0.047 6	0.047 6	0.050 3	0.047 6	0.050 4	0.005 0		-	-	-
Sinaloa Tick18g	0.047 6	0.047 6	0.047 6	0.050 3	0.050 3	0.047 6	0.047 6	0.047 6	0.050 3	0.047 6	0.050 4	0.005 0	0.005 0		-	-
Sinaloa Dog31p	0.044 7	0.044 7	0.044 7	0.047 4	0.047 4	0.044 7	0.044 7	0.044 7	0.047 4	0.044 7	0.047 5	0.061 6	0.061 6	0.061 6		-
Sinaloa Dog56p	0.047 6	0.047 6	0.047 6	0.050 3	0.050 3	0.047 6	0.047 6	0.047 6	0.050 3	0.047 6	0.050 4	0.070 6	0.070 6	0.070 6	0.036 4	
Sinaloa Dog75p	0.108 9	0.108 9	0.108 9	0.111 8	0.111 8	0.108 9	0.108 9	0.108 9	0.111 8	0.108 9	0.112 1	0.138 2	0.135 0	0.138 2	0.098 5	0.096 1

\* El análisis se realizó utilizando el modelo de Máxima Verosimilitud Compuesta.

**Figura 1.** Análisis filogenético del gene *16SrRNA* de *Ehrlichia canis*, de las secuencias de los países Americanos construido mediante el método de Máxima Verosimilitud.



**Figura 2.** Análisis filogenético del gene *16SrRNA* de *Ehrlichia canis*, de las secuencias de los países Americanos construido mediante el método de Máxima Parsimonia.





## Referencias

1. Sainz A, Rouna X, Miró G, Estrada-Peña A, Kohn B, Harrus S, Solano-Gallego L. Guideline for veterinary practitioners on canine Ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit Vectors* 2015; 8:75.
2. Perez M, Bodor M, Zhang C, Xiong Q, Rikihisa, Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1078:110-117.
3. Villaescusa A, Tesourob MA, García-Sanchoa M, Ayllona T, Rodriguez-Francoa F, Sainz A. Evaluation of peripheral blood lymphocyte subsets in family-owned dogs naturally infected by *Ehrlichia canis*. *Comparative Immunology. Microbiol Infect Dis* 2012; 35:391–396.
4. Sosa-Gutierrez CG, Quintero MT, Gaxiola CS, Cota GS, Esteve-Gassent MD, Gordillo-Perez MG. Frequency and clinical epidemiology of Canine Monocytic Ehrlichiosis in Dogs infested with ticks from Sinaloa, Mexico. *J Vet Med* 2013; Article ID 797019 <http://dx.doi.org/10.1155/2013/797019>
5. Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:719–56 [10.1128/CMR.18.4.719-756.2005](https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.719-756.2005)
6. Siarkou VI, Mylonakis ME, Bourtzi-Hatzopoulou E, Koutinas AF. Sequence and phylogenetic analysis of the *16S rRNA* gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. *Vet Microbiol* 2007; 125(3-4):304-12.
7. Carvalho FS, Wenceslau AA, Carlos RSA, Albuquerque GR. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. *Genet Mol Res* 2008; 7(3):657-662.
8. Dumler JS. Ehrlichiosis y anaplasmosis en las Américas. *Acta méd costarric.* 2013; 55(1):1-5.
9. Vinasco J, Li O, Alvarado A, Diaz D, Hoyos L, Tabachi L, Sirigireddy K, Ferguson C, Moro MH. Molecular evidence of new strains of *Ehrlichia canis* from South America. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(8):2716-2719.

10. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molec Biol Evol* 1993; 10:512-526.
11. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Moler Biol Evol* 2011; 28:2731-2739.
12. Walker DH, Paddock CD, Dumler JS. Emerging and Re-emerging Tick-Transmitted Rickettsial and Ehrlichial Infections. *Med Clin N Am*. 2008; 92:1345-1361.

## V. Tick-borne rickettsial pathogens in questing ticks, removed from humans and animals in Mexico

**Running title:** Tick-borne rickettsial pathogens in ticks

Carolina G. Sosa-Gutiérrez\*<sup>1</sup> mcarososagtz@yahoo.com.mx

Margarita Vargas-Sandoval<sup>2</sup> vargasmarga@yahoo.com.mx

Javier Torres<sup>1</sup> jtorresl57@yahoo.com.mx

Guadalupe Gordillo-Pérez<sup>1</sup> lugope2@yahoo.com.mx

1. Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social. Ave. Cuauhtemoc 330, 2do Piso Mexico City, Mexico, C.P. 06720.
2. Departamento de Entomología. Facultad de Agro-biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Av. Lázaro Cárdenas S/N, Col. Revolución, C.P. 60150, Uruapan, Michoacán.

\*Corresponding author. #equally contribution.

Carolina G. Sosa-Gutiérrez, and Guadalupe Gordillo-Perez.

Ave. Cuauhtemoc 330, 2do Piso Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional SXXI.

Mexico City, Mexico, C.P. 06720. Phone (52) 5556276940.

mcarososagtz@yahoo.com.mx, lugope2@yahoo.com.mx

*Journal of Veterinary Science*, 2015. *In press*.

## Resumen

Las enfermedades Rickettsiales transmitidas por garrapatas son encontradas en entornos clínicos médicos y veterinarios. El control de estas enfermedades es difícil, ya que requiere la irrupción de una cadena de transmisión compleja, que implica a las garrapatas y huéspedes vertebrados. La distribución geográfica de las enfermedades está estrechamente relacionada con el vector, siendo un indicador de riesgo para la población expuesta en esas áreas. Un total de 1107 garrapatas (719 adultos, 309 ninfas, y 79 larvas) fueron colectadas de bosques, parques eco-turísticos y huéspedes en 101 áreas en 22 de los 32 estados de México. Las garrapatas colectadas, se colocaron en crioviales de 1,5 ml con etanol al 70%, y se transportaron al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas Emergentes en Centro Médico Nacional Siglo XXI, México, en donde se identificaron a nivel de especie. Las garrapatas se agruparon (477) de acuerdo con la ubicación/sitio de colecta, fecha de colecta, sexo y fase de desarrollo. Se analizaron 51 garrapatas por PCR para confirmar la identificación de las especies obtenida por claves taxonómicas. Se analizaron 477 grupos de garrapatas utilizando técnicas de PCR. *Anaplasma phagocytophilum* fue el patógeno con mayor frecuencia (45 grupos), seguido por *Ehrlichia canis* (42 grupos), *Rickettsia rickettsii* (11 grupos), *E. chaffeensis* (8 grupos) garrapatas, y *R. amblyommii* (1 grupo). *Rhipicephalus sanguineus* fue la garrapata con mayor frecuencia de infección. Nuestros resultados indican que los vectores competentes para los patógenos Rickettsiales se distribuyen a lo largo de las áreas estudiadas en México.

**Palabras clave:** *Anaplasma phagocytophilum*; *Ehrlichia canis*; *E. chaffeensis*; *Rickettsia rickettsii*; *R. amblyommii*; garrapatas.

## Abstract

Tick-borne rickettsial diseases are commonly encountered in medical and veterinary clinical settings. The control of these diseases is difficult, requiring disruption of a complex transmission chain, involving a vertebrate host and ticks. The geographic distribution of the diseases is related to the vector, distribution, which is an indicator of risk for the population exposed in those areas. A total of 1107 ticks (719 adults, 309 nymphs, and 79 larvae) were collected by tick drag from forests, ecotourism parks and hosts at 101 sites in 22 of the 32 states of Mexico. Collected ticks were placed in 1.5 ml cryovials containing 70% ethanol and transported to Emerging Infectious Diseases Lab where they were identified to species. Ticks were pooled (477) according to location/host of collection, date of collection, sex, and stage of development. A total of 51 ticks were assayed by PCR to confirm species identification by morphological methods. A total of 477 pools of ticks were assayed using PCR techniques for selected tick-borne pathogens. *Anaplasma phagocytophilum* was the most commonly detected pathogen (45 pools), followed by, *Ehrlichia canis* (42), *Rickettsia rickettsii* (11), *E. chaffeensis* (8) ticks, and *R. amblyommii* (1). *Rhipicephalus sanguineus* was the tick most frequently positive for selected pathogens. Our results indicate that potential tick vectors positive for rickettsial pathogens are distributed throughout the area surveyed in Mexico.

**Keywords:** *Anaplasma phagocytophilum*; *Ehrlichia canis*; *E. chaffeensis*; *Rickettsia rickettsii*; *R. amblyommii*; ticks.

## Introducción

Las garrapatas transmiten más patógenos que cualquier otro grupo de artrópodos en todo el mundo, afectando a los seres humanos, ganado y animales domésticos alimentándose de sangre [12]. Los *Ixodidos* del género *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Ixodes* y *Amblyomma* son los vectores más importantes para la familia Rickettsiaceae incluyéndo patógenos que causan enfermedades en los seres humanos [26,27].

Los agentes etiológicos de las Enfermedades Rickettsiales Transmitidas por Garrapatas (TBRD, por sus siglas en ingles) son *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia rickettsii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis* y otros patógenos Rickettsiales afectando a los seres humanos, animales silvestres y domésticos. Estos patógenos se mantienen en su ciclo en la naturaleza involucrando mamíferos silvestres y garrapatas [11]. La distribución y epidemiología de las enfermedades transmitidas por garrapatas se refleja en la distribución geográfica y actividades estacionales del vector y reservorios, colocando a los humanos en riesgo de exposición a la garrapata y la posterior infección [11,18,29]. TBRD se encuentran comúnmente en entornos médicos y veterinarios, aumentado en los últimos años la atención por parte de estos. Los signos y síntomas de estas enfermedades en las etapas tempranas son inespecíficos, imitando enfermedades virales benignas, que a menudo conduce al mal diagnóstico y tratamiento, teniendo resultados desafortunados y a veces, fatales [9]. Con la aplicación de métodos moleculares, nuevas especies, cepas o variantes genéticas de estos microorganismos están siendo detectados en las garrapatas de todo el mundo, y la lista de posibles agentes patógenos transmitidos por garrapatas sigue creciendo [29]. La tasa de letalidad oscila 4-25% en pacientes con Rickettsiosis, 3% en Ehrlichiosis y 1% en Anaplasmosis sin tratamiento [38].

La distribución de los vectores de estos patógenos que causan enfermedades, proporcionan información epidemiológica útil sobre la frecuencia de infección que plantean riesgos para la salud [6]. El objetivo de este estudio fue estimar la frecuencia de *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *R. rickettsii* en las garrapatas colectadas de bosques, parques eco-turístico, y los hospederos, incluyendo seres humanos, para

determinar la distribución geográfica y la exposición potencial de los seres humanos y animales domésticos en México.

## **Material y métodos**

**Colecta de las muestras.** Las garrapatas se colectaron entre los años de 1997 a 2013 en los bosques, parques eco-turísticos, vegetación y sobre animales silvestres. Se utilizó la técnica de arrastre cuando se colectó en la hierba, que consiste en una tela de algodón blanco con 1,0 m de ancho x 1,5 m de largo unido a una clavija de madera y una cuerda unida a cada extremo descrita por Chong et al, 2013. Las garrapatas colectadas de varias especies de roedores silvestres capturados vivos y otros pequeños mamíferos, se tomaron de las piezas bucales con unas pinzas finas y suavemente tirando de ellos fuera del huésped colocándose en crioviales de 1,5 ml con etanol al 70%. Las garrapatas fueron transportadas al almacén hasta su identificación. La identificación se basó en sus características morfológicas utilizando las claves taxonómicas pertinentes [15,17,35]. Se preparó un formulario de datos para cada colecta, que incluía el sitio, y fecha de colecta, especie, y etapa de desarrollo.

**Preparación de ADN.** El tejido de las garrapatas se trabajó individualmente, desinfectando por inmersión en solución de etanol al 70% durante cinco minutos, enjuagando con agua estéril, y después se secaron sobre papel de filtro. Las garrapatas adultas fueron disectadas utilizando una técnica aséptica, con una hoja de bisturí estéril para obtener el intestino medio. Para la extracción de ADN en larvas y ninfas se utilizó todo el cuerpo. Las garrapatas se agruparon por etapa de desarrollo y especies después de la identificación. Fueron trabajadas individualmente 68 garrapatas adultas, mientras que se analizaron grupos de adultos (2 garrapatas, 286 grupos), ninfas (3-4 garrapatas, 103 grupos) y larvas (4-5 garrapatas, 20 grupos). La extracción de ADN de las garrapatas se realizó con el Kit DNeasy® Tissue (QIAGEN, Hilden Alemania) según las instrucciones del fabricante. Los patógenos detectados en los grupos, se expresaron como

porcentaje y tasa de infección mínima (MIR), basada en la suposición de que cada agrupación de PCR-positivo contenía al menos una garrapata positiva [13].

**PCR para la identificación de garrapatas.** Se seleccionó el cinco por ciento de las garrapatas (51 garrapatas) colectadas sobre mamíferos y vegetación (7 adultos, 32 ninfas, 12 larvas) para la identificación molecular utilizando el gene *12SrRNA*, y verificar la exactitud de la identificación morfológica.

**PCR para *R. rickettsii*, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* y *E. canis*.** El DNA de las garrapatas se amplificó utilizando iniciadores específicos de especie como se ha descrito anteriormente. El fragmento del gene *16SrRNA* se amplificó a partir de proteínas específicas, excepto *R. rickettsii* para los que se amplificaron el gene *gltA2* y 17kDa. La PCR se realizó como se describe anteriormente [29,32] usando los iniciadores Ge3A-GE10-Ge9F para *A. phagocytophilum* (*16SrRNA* gene), HE1-HE3 para *E. chaffeensis* (*16SrRNA* gene), ECA-HE1 para *E. canis* (gene *16SrRNA*), CS78-CS323 (gene *gltA*) y TZ15-TZ16 (gene *17 kDa*) para *Rickettsia* spp. [32]. Se utilizaron controles positivos a partir del ADN de bazo y corazón de *Peromyscus leucopus* naturalmente infectados con *E. chaffeensis* y *A. phagocytophilum*, y el ADN de un perro infectado con *E. canis* [29,31,32]. Se utilizo como control positivo, el ADN de tejido renal de un paciente infectado con *R. rickettsii*. La mezcla de reacción de PCR consistió en 2 pmol de cada iniciador, 200 mM de concentración de cada desoxinucleósido trifosfato, tampón de PCR, 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Brasil) y de 50-100 ng de ADN de la muestra para cada PCR en un 50 µl de mezcla de reacción.

Los productos de PCR con los tamaños esperados se purificaron mediante el kit de extracción de gel QIAquick® (QIAGEN, CA). Se determinaron las secuencias de nucleótidos en un secuenciador (Applied Biosystem). Las secuencia fueron alizadas a través del software de Chromas lite (v.2.1.1), y alineadas utilizando MEGA v.5. Se compararon con las secuencias genéticas utilizando BLAST.



El análisis de los resultados se realizó mediante Chi cuadrada o la prueba exacta de Fisher con los Odds Ratio calculados con intervalos de confianza del 95%. El valor de  $p < 0,05$  fue considerado como significativo; todos los análisis se realizaron utilizando el programa EpiInfo v. 6 (CDC, Atlanta, GA).

## Resultados

Un total de 1,107 garrapatas se obtuvieron 641 garrapatas de huéspedes, y 466 garrapatas de bosques y vegetación. Se obtuvieron 38 garrapatas de 9 personas, 262 garrapatas de 148 perros, 8 garrapatas de 3 venados, 229 garrapatas de 183 ratones, 6 garrapatas de 1 tortuga, 5 garrapatas de 4 ovejas, 3 garrapatas de 2 cabras, 83 garrapatas de 11 bovinos, 3 garrapatas de 2 sapos, 4 garrapatas de 3 caballos, y 2 garrapatas de un conejo. Los 101 sitios incluyeron a parques nacionales, parques eco-turísticos y sitios recreativos, distribuidos en 22 estados de México (Tabla 1).

Fueron colectados un total de 1,107 garrapatas, incluyendo 16 especies pertenecientes a 6 géneros (tabla 2). *Rhipicephalus sanguineus* fue la garrapata con mayor frecuencia (43,4%), seguido por *Amblyomma cajennense* (12,2%), *A. maculatum* (10,9%), *R. microplus* (9,0%), *A. dissimile* (6,1%), *Ixodes texanus* (1,3%), *R. annulatus* (2,0%), *A. americanum* (1,5%), *Dermacentor nitens* (1,8%), *I. scapularis* (1,5%), *D. andersoni* (1,3%), y *Haemaphysalis leporis-palustris* (1,3%), mientras que las especies restantes solamente representaron el 1,4% (figura 1).

De los 38 garrapatas colectadas de seres humanos, 1/16 (6,3%) de *A. cajennense* fue positivo para *A. phagocytophilum*, y 1/10 (10%) *D. variabilis* fue positivo para *R. rickettsii*, mientras que ninguna garrapata *R. sanguineus* 0 / 12 fue positiva a algún patógeno seleccionado.

Fueron colectadas un total de 466 garrapatas sobre vegetación, las cuales se combinaron en 158 grupos. Fueron positivos para *A. phagocytophilum* 13 (3,8%), seguido de *E. chaffeensis* (6, 3,8%), *E. canis* (5, 3,2%) y *R. rickettsii* (2, 1,3%).

**Cuadro 1.** Sitios colectados y esta evolutivo de las garrapatas.

	State	No. of Sites	Total ticks collected	Stage				Source		
				Female	Male	Nymph	Larvae	Vegetation	Humans	Other animals
<b>Northwest</b>	Baja California	1	4	1	3	0	0	3	1	0
	Sonora	2	9	4	3	2	0	6	2	1 <sup>a,b</sup>
	Sinaloa	32	196	133	34	19	8	0	3	193 <sup>a,b</sup>
<b>Central</b>	Mexico City	2	62	23	18	21	0	11	0	51 <sup>a,c,t</sup>
	Edo.	8	57	19	21	13	4	0	0	57 <sup>a,c,d,f</sup>
	Mexico	2	36	17	8	11	0	29	0	7 <sup>a,c</sup>
	Morelos	2	36	10	12	14	0	32	2	2 <sup>a,g</sup>
	Puebla	1	29	8	7	14	0	21	0	8 <sup>a</sup>
	Hidalgo	10	163	3	41	58	63	83	27	53 <sup>a,b,c,d,e</sup>
	Michoacán									
	Nayarit	2	28	13	5	10	0	21	0	7 <sup>a</sup>
	Jalisco	1	25	8	11	6	0	18	1	6 <sup>a</sup>
	San Luis Potosí	3	3	2	1	0	0	1	0	2 <sup>a</sup>
<b>Northeast</b>	Durango	2	23	7	9	7	0	18	0	5 <sup>a</sup>
	Nuevo León	2	53	22	7	24	0	41	0	12 <sup>a,b,c</sup>
	Chihuahua	1	1	0	1	0	0	0	0	1 <sup>a</sup>
<b>Southeast</b>	Tamaulipas	5	96	55	22	18	3	52	0	20 <sup>a,c,h,k</sup>
	Veracruz	6	49	12	16	21	0	29	0	20 <sup>a,c,h</sup>
	Guerrero	8	91	32	23	36	0	57	2	33 <sup>a,g</sup>
	Oaxaca	9	67	25	16	25	1	31	0	36 <sup>a,c,f</sup>
	Chiapas	2	52	35	10	7	0	7	0	45 <sup>a,e,t,j</sup>
	Tabasco	2	26	17	6	3	0	7	0	19 <sup>a,b,g</sup>
	Yucatan	1	1	0	1	0	0	0	0	1 <sup>a</sup>
<b>Total</b>		<b>101</b>	<b>1107</b>	<b>446</b>	<b>273</b>	<b>309</b>	<b>79</b>	<b>466</b>	<b>38</b>	<b>603</b>

\*Tipo de hospedero, a: humano, b: perro, c: venado, d: ratones, e: tortuga, f: oveja, g: cabras, h: bovinos, i: sapo, and j: caballo.

Se obtuvieron un total de 603 garrapatas sobre animales silvestres y domésticos, colocándose en 281 grupos. En el supuesto de 1 garrapata positiva/grupo, *E. canis* (37/281 12,8%) fue el patógeno transmitida por garrapatas con mayor frecuencia de infección detectado por PCR, seguido por *A. phagocytophilum* (31, 11,0%), *R. rickettsii* (8, 2.9%), *E. chaffeensis* (2, 0,8%), y *R. amblyommii* (1, 0,4%) (GenBank No. de acceso de KP844658-9 y KP84663-65).

Se construyó un árbol filogenético que incluyó a los patógenos transmitidos por garrapatas y sus homólogos más cercanos (figura 2). Se diseñó un mapa que

representa la distribución de los patógenos transmitidos por garrapatas seleccionados detectados por PCR (figura 3).

**Cuadro 2.** Especies de garrapatas, número de grupos de garrapatas y garrapatas positivas.

Tick species	N	A. <i>phagocytophilum</i>	E. <i>canis rickettsii</i>	R. <i>chaffeensis</i>	E. <i>amblyommi</i>	R.
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	207	37	32	7	4	0
<i>R. (Boophilus) microplus</i>	43	2	0	0	0	0
<i>annulatus</i>	8	0	1	0	0	0
<i>Amblyomma cajenense</i>	58	1	1	1	2	1
<i>dissimile</i>	29	1	1	0	0	0
<i>maculatum</i>	58	1	1	1	0	0
<i>americanum</i>	7	1	0	1	2	0
<i>inornatum</i>	3	0	0	0	0	0
<i>imitator</i>	2	0	0	0	0	0
<i>Dermacentor variabilis</i>	22	2	2	0	0	0
<i>nitens</i>	7	0	0	1	0	0
<i>paramapertus</i>	2	0	0	0	0	0
<i>andersoni</i>	6	0	1	0	0	0
<i>Ixodes texanus</i>	9	0	0	0	0	0
<i>scapularis</i>	6	0	2	0	0	0
<i>cookei</i>	3	0	0	0	0	0
<i>sinaloa leporis-</i>	2	0	0	0	0	0
<i>palustris</i>	5	0	1	0	0	0
<b>Total (%)</b>	<b>477</b>	<b>45 (9.4)</b>	<b>42 (8.8)</b>	<b>11 (2.3)</b>	<b>8 (1.7)</b>	<b>1(0.2)</b>

**Figura 1.** Distribución de las garrapatas colectadas en México.

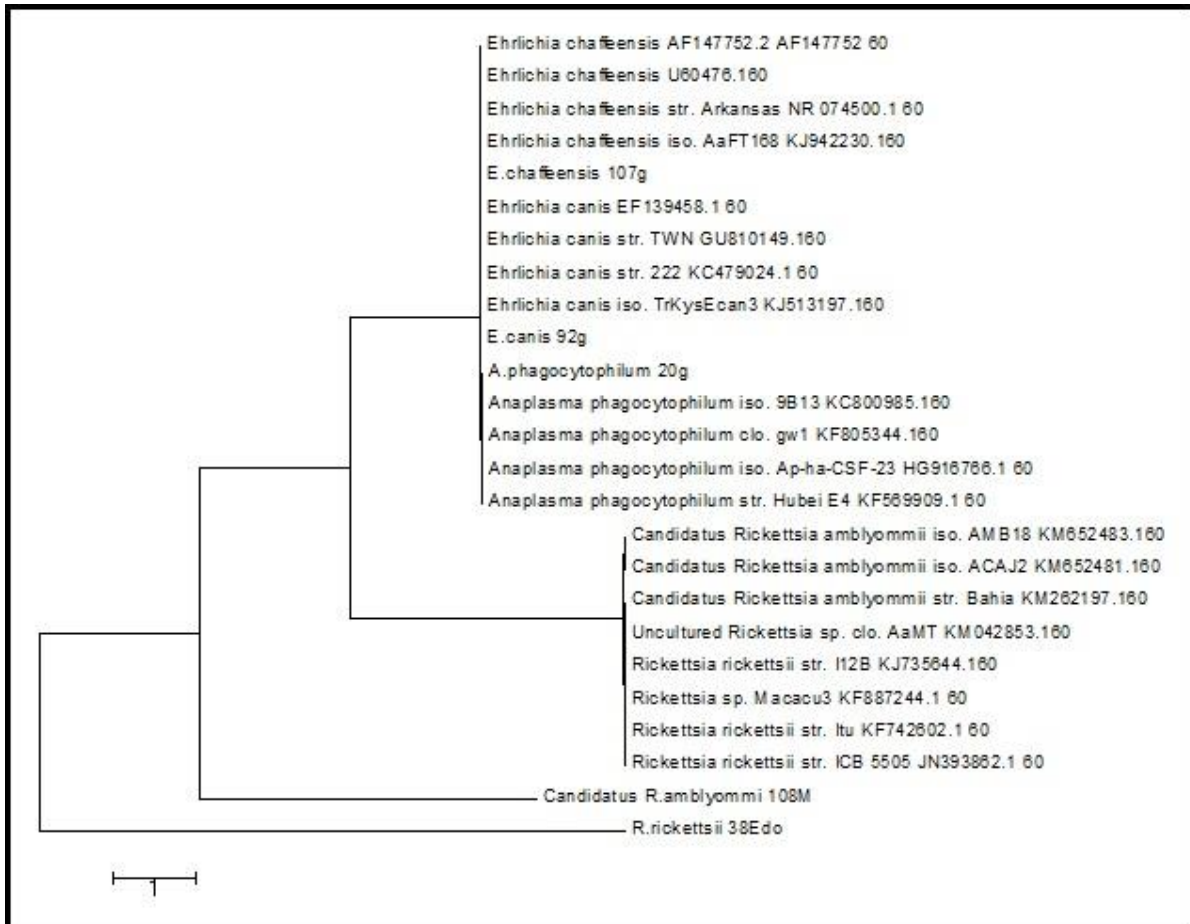


*Anaplasma phagocytophilum* fue el patógeno con mayor frecuencia de infección en el noroeste del país. Se identificaron asociaciones como: *A. phagocytophilum* infectando *A. cajennense*, *A. dissimile*, *A. maculatum* y *D. variabilis*; *E. canis* infectando *A. cajennense*, *A. dissimile*, *A. maculatum*, *I. scapularis* y *H. leporispalustris*; *R. rickettsii* infectar *D. nitens*; y *E. chaffeensis* infectar *A. cajennense*. Es necesario determinar qué asociación entre las garrapatas y patógenos podría resultar en la transmisión del agente, o representar un ciclo enzoótico silencioso del agente.

## Discusión

En México desde 1947, la garrapata *R. sanguineus* se le reconoció como vector transmisor de *R. rickettsii* [4], mientras que en los EE.UU., *D. variabilis* y *D. andersoni* son los vectores competentes del mismo patógeno [28]. Siendo hasta el 2002, *R. rickettsii* identificado en garrapatas *R. sanguineus* como garrapata vector de la fiebre maculosa de las Montañas Rocosas (FMR) en Arizona [10].

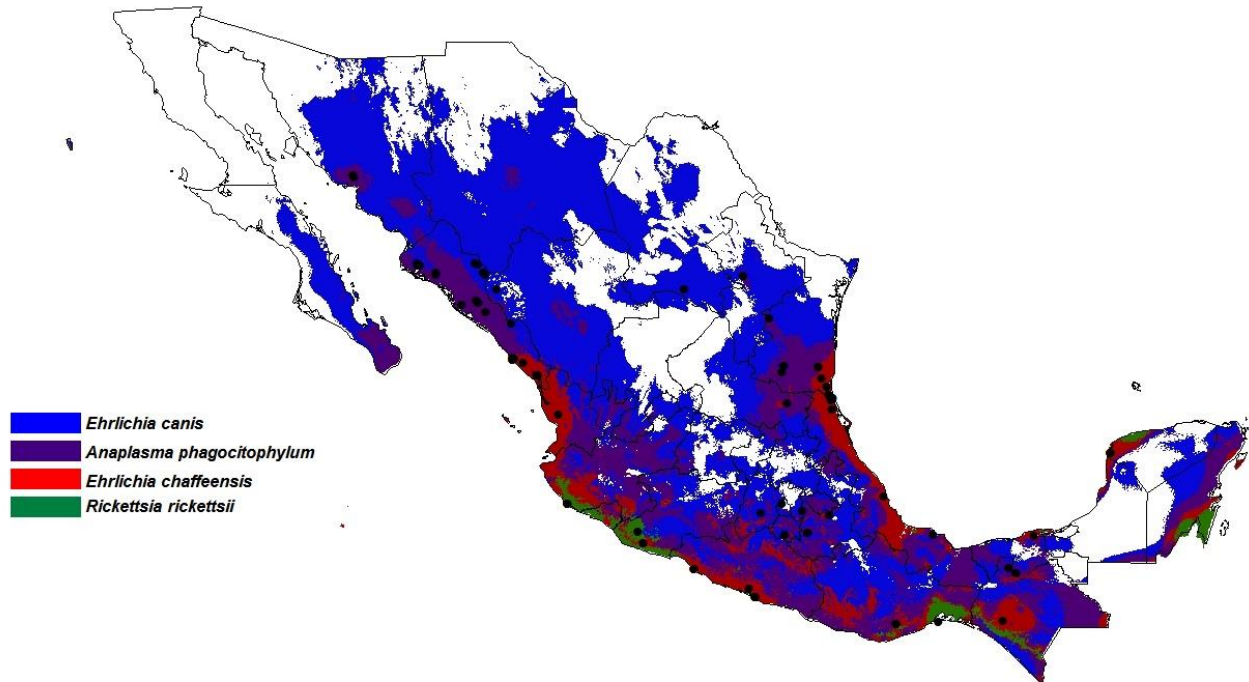
**Figura 2.** Árbol filogenético de los patógenos detectados en las garrapatas colectadas sobre hospederos animales y humanos en México.



En América del Sur se ha informado de *Amblyomma* spp. transmitiendo otra *Rickettsia* [23,25,26]. En los últimos diez años, un brote epidémico de fiebre manchada de las Montañas Rocosas (FMMR) ha sido reportado en la frontera norte de México y se extiende en realidad a 30 estados del país [3,4]. Nuestros resultados son similares a los informes en Panamá, Argentina y Brasil, en donde *R. sanguineus* es un vector competente para la mayoría de los patógenos TBRD [8, 23], encontrando que la garrapata *R. sanguineus* es la garrapata infectada con más frecuencia con estos patógenos. Las especies de garrapatas que transmiten *R. rickettsii* en México son: *R. sanguineus*, *D. variabilis* y *Amblyomma imitator*

[4,27], mientras *Haemaphysalis leporis-palustris* es un vector potencial descrito en la región noroeste de México [13].

**Figura 3.** Distribución de los patógenos Rickettsiales detectados en las garrapatas colectadas alrededor de México.



Se encontró que *R. sanguineus* fue la garrapata con mayor frecuencia, representando el 52,2% de todas las garrapatas examinadas en las regiones de México. Esto es consistente con el hecho de que *R. sanguineus* se considera como una garrapata global capaz de transmitir patógenos tales como *R. rickettsii*, especies de *Ehrlichia* e incluso *Leishmania infantum* [2,22,26,30]. La existencia de co-infecciones en *R. sanguineus* es importante, puesto que se sabe, que más de un patógeno puede coexistir en un solo vector [7].

Encontramos que *A. phagocytophilum* y *E. canis* fueron los patógenos con mayor frecuencia de infección en las garrapatas colectadas en México, mientras que *E. chaffeensis* y *R. rickettsii* fueron menos frecuentes. Un estudio previo en el noreste de México, reportó una prevalencia de 50% infección por *Rickettsia* spp. en garrapatas de la especie *Amblyomma* [23], una alta frecuencia en comparación

con nuestros resultados, a pesar de llevar a cabo una colecta con 16 diferentes especies de garrapatas. Un estudio llevado a cabo en Texas, encontraron garrapatas *A. cajennense* que fueron colectadas sobre las personas, positivas a múltiples patógenos, incluyendo *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp., y *A. maculatum* estaba infectado con *Ehrlichia* spp. y *Rickettsia* spp. [39].

Es el primer reporte de *A. phagocytophilum*, el agente de la Anaplasmosis Granulocítica humana, en México. La enfermedad fue reconocida en seres humanos en los EE.UU. en 1994, y posteriormente en Europa en 1995 [27]. Se prevé que el grupo *Ixodes* esté presente en todos los estados del centro y noreste de México [13,15,17,21]. La distribución principal esperada para *A. cajennense* es la costa noreste de México, que tiene tierras con bajas altitud y temperaturas cálidas. En contraste, las especies de *Ixodes* se predicen principalmente en los estados del norte, caracterizados por la presencia de grandes altitudes, y clima templado [13,21]. En los EE.UU., *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus* han sido encontrados como los principales vectores de *A. phagocytophilum* [8].

La detección del agente de la Ehrlichiosis monocítica humana (*E. chaffeensis*) en garrapatas *R. sanguineus*, *A. americanum* y *A. cajennense* podría desempeñar un papel de transmisión importante en México, pero es necesario más estudios al respecto. En México, la enfermedad fue reportada por primera vez en un paciente de Yucatán, diagnosticado serológicamente por IFA [14]. En nuestro estudio, hemos colectado solamente garrapatas *R. sanguineus* en Yucatán, y fueron positivas a *E. canis*; aunque nuestros resultados indican que se puede producir esta infección en otras áreas de México, incluyendo los estados del sur y norte de México, donde se predice la presencia del vector competente [13,15,17,21].

Las garrapatas *Amblyomma imitator* fueron encontrados sobre *Silvilagus* spp., un vector potencial de *R. rickettsii* y *R. prowasekii*, lo que sugiere la participación de otros mamíferos en el ciclo enzoótico en México [27]. Se describe la presencia de *R. amblyommii* en una garrapata *Amblyomma cajennense* colectada en un estado del noreste de México; *A. cajennense* no se ha informado como vector potencial para el agente *R. amblyommii* en México, solo se ha descrito en *A. cajennense* en la región amazónica del Brasil [14,26] y en *A. neumani* en Argentina [25]. Aunque

la patogenicidad de *R. amblyommii* es aún desconocida, un estudio en Carolina del Norte, EE.UU. informó que 11 de los 25 garrapatas *A. americanum* estudiadas se infectaron con *R. amblyommii*, y encontraron que 3 de cada 6 pacientes tenían anticuerpos reactivos con *R. amblyommii* [1].

En México, tenemos descrito *Ixodes scapularis* en los estados del norte y centro del país desde 1962 [20]. Las garrapatas *Dermacentor andersoni*, se obtuvieron de perros en Sinaloa, un estado en el noroeste de México. Estas garrapatas se han descrito no sólo en nuevas regiones, sino también en nuevos biotipos. Existen diversas explicaciones propuestas, incluyendo el calentamiento global, el impacto del uso de la tierra, y el papel de la fauna silvestre en la dispersión de la garrapata [5,13]. Hasta hace poco, *Dermacentor andersoni* y *D. variabilis* en América del Norte, y *A. cajennense* en América del Sur fueron las únicas especies de garrapatas asociados con rickettsias en el continente americano [28]. Hoy en día, otras especies se han reportado positivas, incluyendo *A. triste* [36] en Uruguay, Argentina y Brasil, *A. maculatum* en Estados Unidos y *Rhipicephalus sanguineus* en Brasil y los EE.UU. [24,40].

La distribución geográfica de TBD generalmente sigue la distribución de sus vectores [16,38]; en el presente estudio hemos documentado la presencia de patógenos en 67 diferentes sitios de México, mostrando que los vectores infectados se distribuyen en todo el país. Además, encontramos *A. phagocytophilum*se distribuída en la mayoría de las regiones estudiadas, *R. rickettsii* sólo en la costa de México, *E. chaffeensis* en los estados centrales y *E. canis* sobre todo en los estados del norte de México.

Estos hallazgos amplían estudios previos en México, limitados a la búsqueda de unos pocos patógenos y garrapatas, sugiriendo que la mayoría de los patógenos rickettsiales son endémicos en el país. Se necesitan más estudios para determinar qué infecciones pudieran transmitir estas garrapatas y causar la enfermedad.

Nuestros resultados proporcionan información sobre organismos Rickettsiales potencialmente patógenos, sus hospederos y garrapatas en México; lo que sugiere la presencia de enfermedades endémicas no reconocidas previamente [37]. El conocimiento relativo a la distribución de garrapatas puede ser útil en la



predicción de la epidemiología de las enfermedades asociadas a determinadas especies de garrapatas [19,37], y también puede proporcionar una oportunidad para examinar la ecología de las zoonosis emergentes o previamente no descritas, para determinar los diferentes roles ecológicos de transmisión de la enfermedad que puedan estar presente [19,32].

La distribución de los patógenos transmitidos por garrapatas está cambiando en todo el mundo, y algunos de estos agentes en México puede representar una amenaza antes no reconocida para la salud humana y animal. Nuestros resultados ponen de manifiesto la necesidad de continuar con estudios para vigilar la aparición de nuevas enfermedades enzoóticas, que pueden representar amenazas desconocidas para la salud pública de las poblaciones expuestas.

### **Agradecimientos**

Los autores quieren agradecer a David H. Walker, por la revisión gramatical y crítica del manuscrito.

### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

### **References**

1. **Apperson CS, Engber B, Nicholson WL, Mead DG, Engel J, Yabsley MJ.** Tick-borne disease in North Carolina: is "*Rickettsia amblyommii*" a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain spotted fever?. Vector-Borne Zoo Dis 2008, 8:15-24.
2. **Burlini L, Texeira KR, Szabó MP, Famadas KM.** Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern?. Exp Appl Acarol 2010, 50:361-374.
3. **Bustamante ME, Varela G, Mariotte CO.** Estudios de fiebre manchada en México: fiebre manchada en la Laguna. Revta Inst Salubr Enferm Trop 1946, 7:39-49.

4. **Bustamante ME, Varela G.** Estudios de fiebre manchada en México: papel del *Rhipicephalus sanguineus* en la transmisión de la fiebre mancha de en la República Mexicana. *Revta Inst Salubr Enferm Trop* 1947, 8:139-141.
5. **Brouqui P: Ehrlichiosis in Europe.** In *Rickettsiae and Rickettsial Diseases at the Turn of the Millenium*. D. Raoult & P. Brouqui, Eds. 2002 pp. 220-232. Elsevier. Paris.
6. **Bröker M.** Following a tick bite: double infections by tick-borne encephalitis virus and the spirochete *Borrelia* and other potential multiple infections. *Zoo and Pub Health* 2011, 59:176-180.
7. **Chmielewska-Bedora J, Moniuszko A, Zuliewicz-Sobczak W, Zwolinski J, Piatek J, Pancewicz S.** Serological survey in persons occupationally exposed to tick-borne pathogens in cases of co-infections with *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella* spp. and *Babesia microti*. *Ann Agric Environ Med* 2012, 19:271-274.
8. **Danta-Torres F, Chomel BB, Otranto D.** Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends in Para* 2012, 28:437-443.
9. **Danta-Torres F, Giannelli A, Otranto D.** Starvation and overwinter do not affect the reproductive fitness of *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol* 2012, 185:260-264.
10. **Demma LJ, Traeger MD, Nicholson WL, Paddock CD, Blau DM, Eremeeva ME, Dasch GA, Levin ML, Singleton J, Zaki SR, Cheek JE, Swerdlow DL, Mcquiston JH.** Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *N Engl J Med* 2005,;587-594.
11. **Dong J, Olano JP, McBride JW, Walker DH.** Emerging pathogens and successes of molecular diagnostics. *J Mol Diagn.* 2008, 10:185-197.
12. **Durden LA.** Taxonomy, host associations, life cycles and vectorial importance of ticks parasiting small mammals. In: Morand, S., Krasnov, B.R., Pulin., R. (Edits). *Micromammals and Macroparasites. From Evolutionary Ecology to Managment.* Springer Verlag, Tokyo, 2006. pp- 91-102.
13. **Feria-Arroyo TP, Castro-Arellano I, Gordillo-Perez G, Cavazos A, Vargas-Sandoval M, Grover A, Torres J, Medina RF, Perez de León AA, Esteve-**

**Gassent MD.** Implications of climate change on the distribution of the tick vector *Ixodes scapularis* and risk for Lyme disease in Texas-Mexico transboundary region. *Parasit Vectors* 2014, 7:199. Doi:10.1186/1756-3305-7-199.

14. **Góngora-Bianchi RA, Zavala-Velazquez J, Castro-Sansores CJ, González-Martínez P.** First case of human ehrlichiosis in Mexico. *Emerg Infect Dis* 1999, 5:481-482.

15. **Gordillo-Pérez G, Vargas M, Solorzano-Santos F, Rivera A, Polaco OJ, Alvarado L, Muñoz O, Torres J.** Demonstration of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto infection in ticks from the northeast of Mexico. *Clin Microbiol and Infect.* 2009, 15:496-498.

16. **Gubler D, Raiter P, Ebi K, Yap W, Nasci R, Patz J.** Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector and rodent-borne diseases. *Enviro Heath Persp* 2001, 102:223-233.

17. **Guzman-Cornejo C, Robbins R.** The genus *Ixodes* (Acari: Ixodidae) in Mexico: adult identification keys, diagnoses, host, and distribution. *Rev Mex Biod* 2010, 81:289-298.

18. **Hamer SA, Tsao JI, Walker D, Mansfield LS, Foster ES, Hickling GJ.** Use of tick surveys and serosurveys to evaluate pet dogs as a sentinel species for emerging Lyme disease. *Am J Vet Res* 2009, 70:49-56.

19. **Hinrichsen VL, Whitworth UG, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Mather TN.** Assessing the association between the geographic distribution of deer ticks and seropositivity rates to various tick-transmitted disease organisms in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2001, 218:1092-1097.

20. **Hoffman A.** Monografía de los *Ixodoidea* de México. Parte 1. *Rev Soc Mex Hist Nat* 1962, 23: 191-307.

21. **Illoldi-Rangel P, Rivaldi CL, Sissel B, Fryxell T, Gordillo-Perez G, Rodriguez-Moreno A, Williamson P, Montiel-Parra G, Sanchez-Cordero V, Sarkar S.** Species distribution models and ecological suitability analysis for potential tick vectors of Lyme disease in Mexico. *J of Trop Med* 2012, 959101. doi:10.1155/2012/959101

22. **Ismail N, Bloch, KC, McBride JW.** Human ehrlichiosis and anaplasmosis. Clin Lab Med 2009, 30:261-292.
23. **Jones EK, Clifford CM, Keirans JE, Kohls GM.** The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodidae), with a key to the species of *Amblyomma* in the western hemisphere. Brigham Young University. Scie Bull Biol Ser 1972, 12, pp xx.
24. **Medina-Sanchez A, Bouyer DH, Alcantara-Rodriguez V, Mafra C, Zavala-Castro J, Walker DH.** Detection of typhus group rickettsia in *Amblyomma* ticks in the state of Nuevo Leon, Mexico. Ann NY Acad Sci 2005, 1063:327-332.
25. **Labruna MB, Pacheco RC, Nava S, Brandao PE, Ricjzenhain LJ, Guglielmone AA.** Infection by *Rickettsia belli* and Candidatus "*Rickettsia amblyommii*" in *Amblyomma neumanni* ticks from Argentina. Micro Ecol 2007, 54:126-133.
26. **Labruna MB, Whitworth T, Bouyer DH, McBride J, Camargo LMA, Walker DH.** *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the Sata or Rondônia, Western Amazon, Brazil. J Med Entomol 2004, 41:1073-1081.
27. **Oliveira KA, Pinter A, Medina-Sanchez A, Boppana VD, Wikel SK, Walker DH.** *Amblyomma imitator* ticks as vector of *Rickettsia rickettsii*, Mexico. Emerg Infect Dis. 2010, 16:1282-1284.
28. **Parola P, Raoult D.** Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. Clin Infect Dis 2001, 32:897-928.
29. **Pfäffle M, Littwin N, Murders SV, Petney TN.** The ecology of tick-borne diseases. Int J Paras 2013, 43:1059-1077.
30. **Sanogo YO, Parola P, Shpynov S, Camicas JL, Brouqui P, Caruso G, Raoult D.** Genetic diversity of bacterial agents detected in ticks removed from asymptomatic patients in Norrtheastern Italy. Ann NY Acad Sci 2003, 990: 182-190.
31. **Solano-Gallegos L, Rossi L, Scroccaro AN, Montarsi F, Caldin M, Furlanello T, Trotta M.** Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* males removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. Parasit Vectors 2012, 5:98.

32. **Sosa-Gutierrez CG, Quintero MT, Gaxiola CS, Cota GS, Esteve-Gassent MD, Gordillo-Perez MG.** Frequency and clinical epidemiology of canine monocytic ehrlichiosis in dogs infested with ticks from Sinaloa, Mexico. *J Vet Med* 2013, 797019. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/797019>.
33. **Sosa-Gutierrez CG, Vargas M, Torres J, Gordillo-Pérez MG.** Tick-borne rickettsial pathogens in rodents from Mexico. *J Biome Sci Eng* 2014, 7:884-889.
34. **Tinoco-Gracia L, Quiroz-Romero H, Quintero-Martinez MT, Rentería-Evangelista TB, Barreras-Serrano A, Hori-Oshima S.** Prevalence and risk factors for *Borrelia burgdorferi* infection in Mexicali, Baja California a Mexico-US border city. *Int J Appl Res Vet Med* 2008, 6:161-165.
35. **Vargas-Sandoval M, Priego-Santander AG, Larrazábal A, Sosa-Gutierrez CG, Lara-Chávez MB, Ávila-Val TC.** Potential species distribution and richness of Ixodidae ticks associated with wild vertebrates from Michoacán, Mexico. *J Geo Inf Sys* 2014, 6: 2014
36. **Venzal JM, Estrada-Peña A, Portillo A, Mangold AJ, Castro O, De Souza CG.** *Rickettsia parkeri*: a rickettsial pathogen transmitted by ticks in endemic areas for spotted fever rickettsiosis in southern Uruguay. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2012, 54:131-134.
37. **Vu HV, Almeras L, Socolovschi C, Raoult D, Parola P, Pages F.** Monitoring human tick-borne disease risk and tick bite exposure in Europe: available tools and promising future methods. *Ticks Tick Borne Dis* 2014, 5: 607-619.
38. **Walker DH, Paddock CD, Dumler JS.** Emerging and re-emerging tick-transmitted rickettsial and ehrlichial Infections. *Med Clin N Am* 2008, 92:1345-1361.
39. **Williamson P, Billingsley P, Teltow G, Seal J, Turnbough M, Atkinson S.** *Borrelia*, *Ehrlichia*, and *Rickettsia* spp. in ticks removed from persons, Texas, USA. *Emerg Infect Dis* 2010, 16(3):441-446.
40. **Wikswø ME, Hu R, Metzger ME, Ereemeeva ME.** Detection of *Rickettsia rickettsii* and *Bartonella henselae* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from California. *J Med Entomol* 2007, 44:158-162.

## **VI. Fatal Human Monocytic Ehrlichiosis in a 31-year old woman, Mexico**

Carolina G. Sosa-Gutiérrez, Fortino Solorzano-Santos, David H. Walker, Javier Torres, Carlos A. Serrano, and Guadalupe Gordillo-Perez.

Author affiliations: Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Mexico City, Mexico (C. G. Sosa-Gutiérrez, F. Solorzano-Santos, J. Torres, G. Gordillo-Perez); Hospital Infantil de México Federico Gómez, México City, Mexico (C. A. Serrano); University of Texas Medical Branch, Texas, USA (D. H. Walker).

*Emerging Infectious Diseases*, Vol. 22, No. 5. 2015.

## Resumen

La Ehrlichiosis Monocítica Humana es una enfermedad de curso febril provocada por *Ehrlichia chaffeensis*, una bacteria intracelular obligada transmitida por garrapatas. Se presenta un caso letal de infección provocado por *Ehrlichia chaffeensis* en una mujer inmunocompetente de 31 años, sin historial descrito de mordedura de garrapata. *E. chaffeensis* tiene que ser buscado en pacientes mexicanos con leucopenia, trombocitopenia y transaminasas hepáticas elevadas.

Palabras claves: *Ehrlichia chaffeensis*, Ehrlichiosis Monocítica humana.

## ABSTRACT

Human monocytic ehrlichiosis is a febrile illness caused by *Ehrlichia chaffeensis*, an obligately intracellular bacterium transmitted by ticks. A fatal case of *Ehrlichia chaffeensis* infection in an immunocompetent 31-year-old Mexican woman, without a history of tick-bite is described. *E. chaffeensis* should be investigated in Mexican patients and leukopenia, thrombocytopenia and elevated liver enzymes.

Key words: *Ehrlichia chaffeensis*, Human Monocytic Ehrlichiosis.

## Introducción

*Ehrlichia chaffeensis* es una bacteria intracelular obligada, caracteriza por ser un patógeno de importancia médica y veterinaria. Los primeros casos de Ehrlichiosis Monocítica Humana (HME) se describieron en 1987, y el agente etiológico fue posteriormente identificado en los Estados Unidos de América como *Ehrlichia chaffeensis*, una bacteria perteneciente a la familia Anaplasmataceae (1). *Ehrlichia chaffeensis* se transmite por las garrapatas duras, siendo su vector competente la garrapata *Amblyomma americanum*, y los reservorios incluyen animales domésticos y silvestres (2,3). La mayoría de los casos en los EE.UU. se producen entre los meses de abril a septiembre. Generalmente, la Ehrlichiosis es una enfermedad auto-limitante con síntomas inespecíficos similares a la gripe. Los pacientes presentan fiebre, malestar, cefalea, mialgia, leucopenia en 60% a 70%, trombocitopenia, y el 80% a 90% de los pacientes presentan los niveles de transaminasas séricas elevadas (4,5). La evidencia serológica de infección puede estar ausente durante la fase aguda de la enfermedad. En el 50% de los casos se requiere hospitalización y de esos casos, hay una tasa de mortalidad entre el 2% al 3% (6).

En México se ha reportado un solo caso de *E. chaffeensis* (7). Recientemente *E. chaffeensis* ha sido identificado en *Rhipicephalus sanguineus* y *A. cajennense*. Estos vectores se encuentran en todo México (8).

**El estudio.** Una mujer de 31 años de edad, previamente sana del Estado de México, México fue admitida en el departamento de emergencia a finales de agosto de 2013; presentando un curso de 15 días con fiebre, escalofríos, dolores musculares, malestar general, astenia y cefalea. No hay antecedentes de viajes en los últimos tres meses antes de la presentación del cuadro clínico. No hay antecedentes de mordedura de garrapata. Trabajaba en un mercado, en la venta de frutas y verduras. A la exploración física estaba confundida, con distress respiratorio leve, hepato-esplenomegalia, taquicardia y normotensiva. Estudios realizados en el laboratorio de admisión mostraron leucopenia ( $900/\text{mm}^3$ ), neutropenia ( $310/\text{mm}^3$ ), linfocitos ( $590 / \text{mm}^3$ ) y trombocitopenia ( $76.000/\text{mm}^3$ )



plaquetas), anemia (hemoglobina 8,2 g/dl), AST 2748 UI/L, y ALT 350 IU/L. Se realizó una evaluación completa de sepsis, incluyendo cultivos de sangre, evaluación morfológica y cultivo de aspirado de médula ósea. El aspirado de médula ósea no mostró cambios significativos. La tomografía computarizada mostró hepato-esplenomegalia y se observó un pequeño derrame pericárdico, la ecografía mostró una nefromegalia bilateral, y la ecocardiografía reveló un pequeño derrame pericárdico y una fracción de eyección (FE) del 59%.

El paciente fue ingresado a la unidad de cuidados intensivos (UCI), y sometido a transfusiones de sangre (células rojas, plasma y plaquetas). Se inició la antibió-terapia con Levofloxacino, Amikacina y Meropenem. En el tercer día en la UCI, el paciente continuó con pancitopenia y AST 674 UI/L, ALT 105 UI/L. Se evaluaron sangre, hígado, bazo y muestras de tejidos para *Mycobacterium* spp y *Rickettsia* spp mediante PCR. Los cultivos de sangre y médula ósea permanecieron negativos. No se detectaron mórulas en los frotis de sangre periférica y la médula ósea, pero una estructura de mórula, se observó en la biopsia hepática.

Se administró prednisona, por la sospecha de síndrome hemofagocítico. En el primer día en la UCI, la fiebre persistió, y presentó cambios en el estado mental como confusión y un episodio psicótico con síntomas de ansiedad. Fue evaluada por un psiquiatra, que le recetó benzodiazepinas.

Las pruebas de PCR detectaron *Ehrlichia chaffeensis* en la sangre, iniciando el tratamiento con doxiciclina (100 mg/12 horas) después de 24 días en la UCI. Dos días más tarde, el paciente desarrolló shock hipovolémico por hemorragia. En el segundo día de tratamiento la fiebre disminuyó, pero el paciente desarrolló shock séptico e insuficiencia respiratoria aguda por lo cual requirió asistencia ventilatoria mecánica. En el cuarto día de tratamiento con doxiciclina, la paciente desarrolló insuficiencia renal aguda, y se inició la hemodiálisis. El día 10 presentó fallas multi-sistémicas con inestabilidad hemodinámica, desarrollando una respuesta al soporte inotrópico, y la paciente murió.

Los estudios de laboratorio revelaron la ausencia de anticuerpos contra la Hepatitis A, B, C, y E, parvovirus B-19 y VIH. La PCR para *Mycobacterium* spp.

fue negativo. El estudio histopatológico de hígado mostró necrosis centrolobulillar hepática, esteatosis macrovesicular, y la inflamación linfocitaria (Figura 1). Post-mortem, el diagnóstico de HME se confirmó mediante amplificación por PCR anidada del gen *16S rRNA* de los tejidos bazo e hígado, usando los iniciadores externos e internos como se describió anteriormente (8). La secuenciación de los productos de PCR demostrando un 99,8% de homología con *Ehrlichia chaffeensis* str. Arkansas (Genebank no. KT308164). Fue negativa la reacción de PCR para *A. phagocytophilum* y *R. rickettsii*.

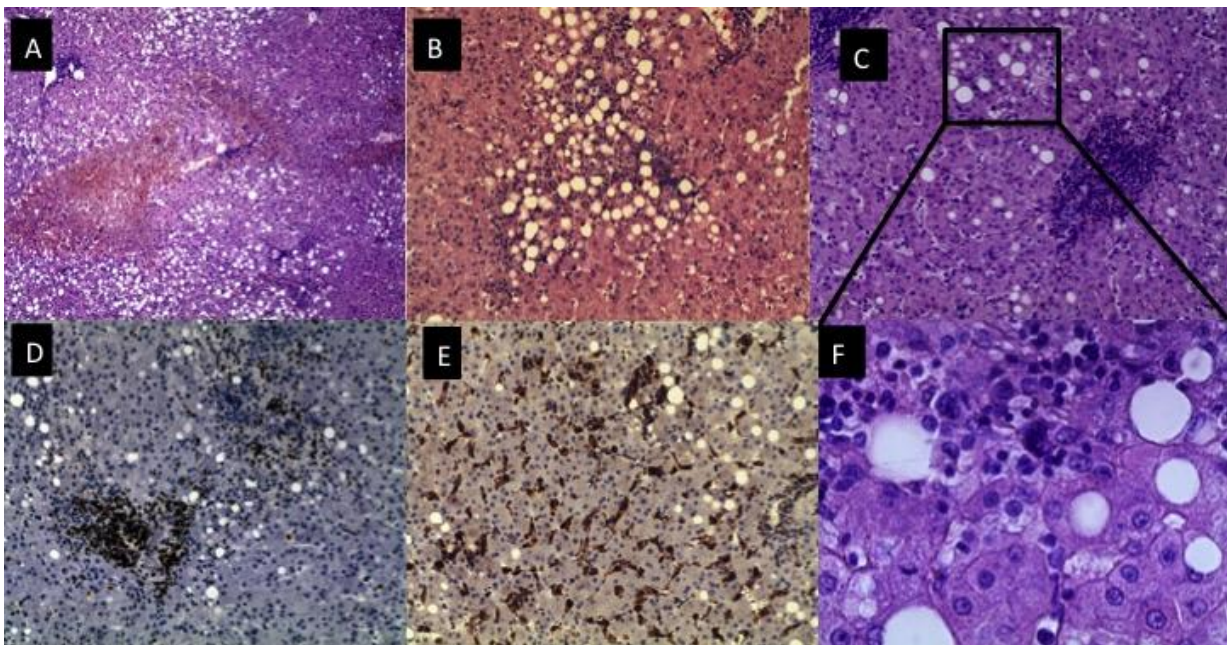


Figura 1. Lesiones A y B. necróticas en la distribución desigual, macro vesicular esteatosis e infiltrado inflamatorio linfocitario (H & E 1: 10x, 2: 40X). C, Las agrupaciones de células en el lóbulo del hígado (H & E; 40x). D, inmunohistoquímica linfocitos T (CD3) (10x). E, inmunohistoquímica manchado de los macrófagos (CD68) y la hiperplasia de células de Kupffer. F, células Multinucleus en parenquimal (H & E 40x).

Enviamos tejidos de hígado, bazo, ADN y muestras de suero al Laboratorio de Investigaciones Rickettsiales y Ehrlichiales de la Universidad de Texas Medical Branch en Galveston, EE.UU. En UTMB, se amplifican mediante PCR en tiempo real como se ha descrito previamente (9), dos fragmentos positivos del gene *dsb*

para *E. chaffeensis* con una homología del 100% para la cepa Arkansas. Los resultados de las pruebas de ELISA e IFA se realizaron para el diagnóstico serológico (los controles positivos fueron proporcionados por Jeremy McBride), y la muestra de suero fue positiva a ELISA con títulos 1:100 títulos para las proteínas PRT-120 y PRT-128, y títulos > 1/64 de IgG para IFA, considerados positivos, con un punto final de titulación a 1:512 (Figura 2).

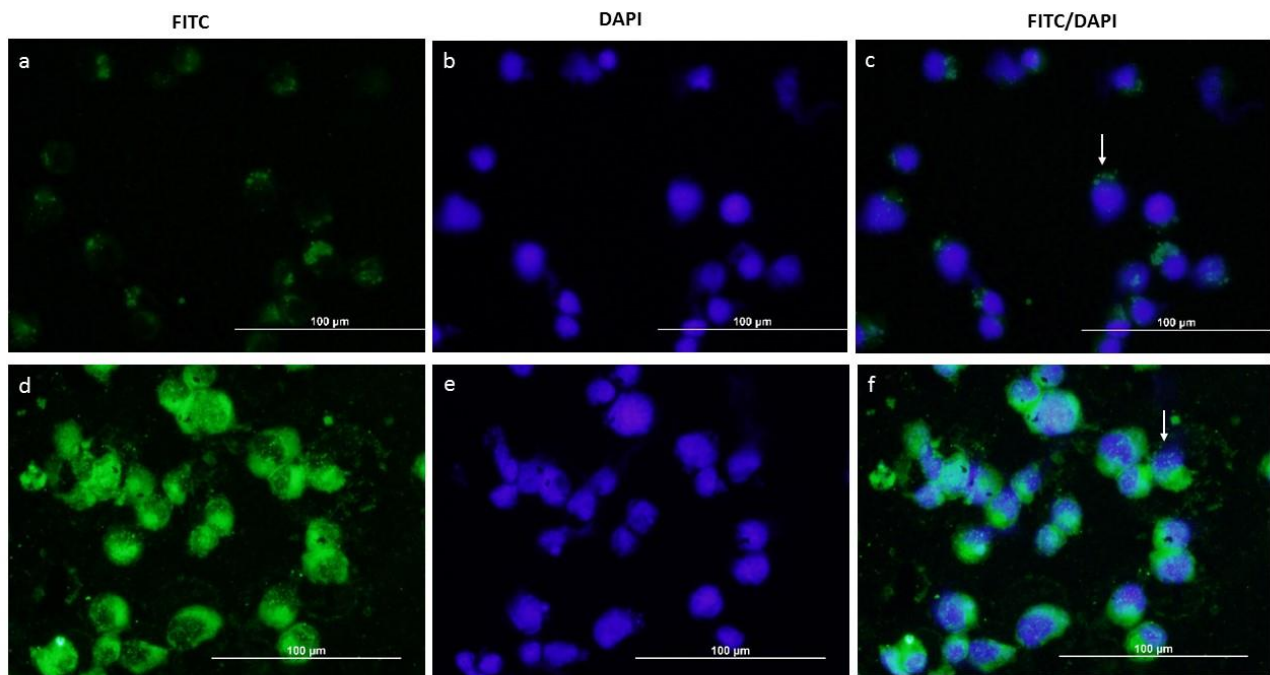


Figura 2. Prueba de IFA. A-C: control positivo de *Ehrlichia chaffeensis*. D-F: muestra de suero con una titulación de 1: 512 positiva a *Ehrlichia chaffeensis*. La flecha marca las mórulas infectando las células.

Góngora et al. (1999) habían informado un caso probable de HME en México (7). En un estudio reciente se detectó *E. chaffeensis* en un 5,5% de ratones *Peromyscus* spp. en 31 sitios diferentes en México. La presencia de este patógeno en un huésped silvestre es una evidencia más de que el ciclo de los reservorios potenciales y competentes está presentes (8). Este es un riesgo potencial para la población expuesta. En este caso, el paciente fue ingresado en el hospital con 32 días de manifestaciones clínicas inespecíficas, destacando la presencia de

hepato-esplenomegalia y leucopenia, anemia, trombocitopenia y aumento de las concentraciones de transaminasas en suero. Algunos autores han sugerido que la tríada clínica de leucopenia, trombocitopenia y transaminasas séricas elevadas en un paciente febril sin una erupción son comunes en HME (10). El paciente desarrolló una disfunción multiorgánica y anomalías hematológicas, la cual persistió a pesar del tratamiento con doxiciclina. La mortalidad es generalmente debida a las complicaciones como el síndrome de dificultad respiratoria aguda o sepsis con fallo multiorgánico (11). HME se ha asociado con el síndrome de activación de macrófagos (12,13).

Múltiples manifestaciones neurológicas se han reportado, y se consideran comunes en pacientes con Ehrlichiosis, incluyendo cefalea severa, confusión, letargo, hiperreflexia, clonus, fotofobia, parálisis del nervio craneal, convulsiones, visión borrosa, rigidez de nuca, y ataxia (13). Nuestra paciente presentó cambios en el estado mental, confusión y un episodio psicótico que no mejoró con la terapia de antibióticos (14). La presencia de alteraciones del estado mental es un hallazgo clínico predictivo de los resultados anormales de LCR.

Los casos fatales de la Ehrlichiosis monocítica humana son poco frecuentes en México, y hasta nuestro conocimiento, este es el primer caso confirmado de Ehrlichiosis monocítica fatal en el país. El curso fatal se ha descrito en un modelo murino asociado con una cepa de *Ehrlichia* que induce un síndrome similar al choque tóxico con alto nivel de TNF- $\alpha$  en el suero (12). La infección letal es a menudo confundida por el hecho de que los signos y síntomas pueden imitar hallazgos típicos comúnmente asociados con otras infecciones como dengue, Fiebre maculosa de las Montañas Rocosas, Tifus murino, y otras enfermedades febriles mal diagnosticadas (15) que son comunes en México.

La enfermedad causada por *Ehrlichia* es inespecífica y requiere un alto índice de sospecha para el diagnóstico (8). La estacionalidad también debe tenerse en cuenta, con la alta incidencia de casos humanos durante el verano, también observado cerca de la estación del patrón de actividades de las garrapatas. La evidencia serológica de infección puede estar ausente durante la enfermedad

aguda temprana (15), se recomienda a los casos sospechosos uso de PCR para confirmar el diagnóstico.

## Referencias

1. Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. Ehrlichia chaffeensis, a new species associated with human ehrlichiosis. J Clin Microbiol. 1991 29(12):2838–2842.
2. Davidson WR, Lockhart JM, Stallknecht DE, Howerth EW, Dawson JE, Rechav Y. Persistent *Ehrlichia chaffeensis* infection in white-tailed deer. J Wildl Dis. 2001;37:538–546
3. Ewing SA, Dawson JE, Kokan AA, Barker RW, Warner CK, Panciera RJ, Fox JC, Kokan KM, Blouin EF. Experimental transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) among white-tailed deer by *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol. 1995.32:368-374.
4. Sehdev AE, Dumler JS. Hepatic pathology in human monocytic ehrlichiosis. *Ehrlichia chaffeensis* infection. Am J Pathol 2003; 119:859-865.
5. Stone JH, Dierberg K, Aram G, Dumler JS. Human monocytic ehrlichiosis. J Am Med Assoc. 2004;292(18): 2263-2270.
6. Dumler JS, Walker DH. Tick-borne ehrlichiosis. Lancet Infect Dis 2001;1:21 – 28.
7. Gongóra-Biachi RA, Zavala-Velázquez J, Castro-Sansores CJ, González-Martínez P. First case of human ehrlichiosis in Mexico. Emerg Infect Dis. 1999; 5:481.
8. Sosa-Gutierrez CG, Vargas SM, Torres J, Gordillo-Perez MG. Tick-borne Rickettsial pathogens in rodents from Mexico. J Biomed Sci Eng 2014; 7:884-9.
9. Selvy DP, Luo T, McBride JW. *Ehrlichia chaffeensis* exploits host SUMOylation pathways to mediate effector-host interactions and promote intracellular survival. J Am Soc Microbiol. 2014; 82(10)4154-4168.
10. Cunha BA, Chandrankunnel JG, Hage JE. *Ehrlichia chaffeensis* human monocytic ehrlichiosis with pancytopenia. Scand J Infect Dis. 2012; 44(6):473-474.

11. Yachoui R. Multiorgan failure related to human monocytic ehrlichiosis. *BMJ Case Rep.* 2013. 22;2013. pii: bcr2013008716.
12. Nahed I, Stevenson HL, Walker DH. Role of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-10 in the pathogenesis of severe murine monocytotropic ehrlichiosis: Increased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to fatal ehrlichial infection. *Infect Immun* 2006;74:1846-1856.
13. Kumar N, Goyal J, Goel A, Shakoory B, Chatham W. Macrophage activation syndrome secondary to human monocytic ehrlichiosis. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2014; 30(Suppl 1):145-147.
14. Ratnasamy N, Everett ED, Roland WE, McDonald G, Caldwell CW Central nervous system manifestations of human ehrlichiosis. *Clin Infect Dis.* 1996; 23:314–319.
15. Paddock CD, Finley RW, Wright CS, Robinson HN, Schrodt BJ, Lane CC, et al. *Rickettsia parkeri*, rickettsiosis and its clinical distinction from Rocky Mountain spotted fever. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 1188-1196.

**VII. Impact of climate change on the distribution of *Rhipicephalus sanguineus* the competent vector of *Ehrlichia canis*, the agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis in Mexico**

Carolina G. Sosa-Gutiérrez\* mcarososagtz@yahoo.com.mx  
Teresa Patricia Feria Arroyo<sup>b&</sup> teresa.feriaarroyo@utrgv.edu  
Margarita Vargas-Sandoval<sup>c</sup> vargasmarga@yahoo.com.mx  
Maria D. Esteve-Gassent<sup>d</sup> MEsteve-Gassent@cvm.tamu.edu  
Javier Torres<sup>a</sup> jtorresl57@yahoo.com.mx  
Maria G. Gordillo-Pérez<sup>a&</sup> \_lugope2@yahoo.com.mx

<sup>a</sup> Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, UMAE Pediatría, CMN SXXI, IMSS. Mexico City, Mexico.

<sup>b</sup> Biology Department. The University of Texas- rio Grande Valley. 1201 West University Drive Edinburg, Texas, 78539, EUA.

<sup>c</sup> Facultad de Agrobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán.

<sup>d</sup> Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University, College Station, TX-77843, USA.

&These authors contributed equally to the work.

\* Corresponding author.

Sosa-Gutierrez C.G: Tel:+525517808062; mcarososagtz@yahoo.com.mx.

*Parasites & Vectors, In submitting.*

## Resumen

La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* es el vector competente de *Ehrlichia canis*, el agente causal de la Ehrlichiosis Monocítica Canina (CME). CME es una enfermedad emergente en la medicina veterinaria, que se caracteriza por un trastorno de múltiples fases que progresa en tres etapas: aguda, subclínica y crónica. Hasta la fecha, hay poco conocimiento sobre la distribución de los vectores de *E. canis* en México. Por otra parte, no existen estudios que evalúen la influencia del cambio climático en la distribución de los vectores. En el presente estudio, se presenta la distribución potencial actual y futura (año 2050) de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* positiva a *E. canis*, utilizando un algoritmo de máxima entropía. Las proyecciones generadas se basan en cuatro modelos generales de circulación (CCCMA, CSIRO, HADCM3 y NIES99) y dos escenarios del IPCC (A2 y B2). Un total de 384 garrapatas en 130 localidades georreferenciadas fueron utilizados para construir el modelo de distribución del hábitat actual y futuro, adecuado para los vectores competentes de *E. canis*. Todos los modelos presentaron un AUC > 0.85, lo que indica que los modelos son robustos. Las proyecciones muestran un cambio en la distribución de las especies en seis de los ocho escenarios considerados en este análisis de su gama actual, debido al cambio climático en áreas nuevas. Este enfoque ecológico en todo el país podría ayudar a delinear recomendaciones para futuras prioridades de investigación, y para el diseño de medidas de salud pública en México.

**Palabras clave:** *Ehrlichia canis*; *Rhipicephalus sanguineus*; Modelos de distribución de las especies; Cambio climático



## **Abstract**

The tick *Rhipicephalus sanguineus* is the competent vector of *Ehrlichia canis*, the causative agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME). CME is an emerging disease in veterinary medicine, which is characterized by a multiphase disorder that progresses in three stages: acute, subclinical, and chronic. To date, there is little knowledge regarding the vectors distribution of *E. canis* in Mexico. Furthermore, there are no studies that assess the influence of climate change on the distribution of vectors of CME. In the present study, we forecast the current and future (year 2050) potential distribution of *Rhipicephalus sanguineus* tick to *E. canis*, using a maximum entropy algorithm. The projections generated were based on four general circulatory models (CCCMA, CSIRO, HADCM3, and NIES99) and two IPCC scenarios (A2 and B2). A total of 384 ticks in 130 unique geo-referenced localities were used to construct the model of present and future suitable habitat distribution for competent vectors of *E. canis*. All models had AUC >0.85, which indicates that the models are robust. The projections showed a shift in the distribution of target species in six of the eight scenarios considered in this analysis from its current range due to climate change in new areas. This countrywide ecological approach to CME could help to delineate recommendations for future research priorities to design public health measures in Mexico.

**Key words:** *Ehrlichia canis*; *Rhipicephalus sanguineus*; species distribution models; climate change

## Introducción

*Ehrlichia canis*, un patógeno potencialmente zoonótico (4,5), es el agente causal de la Ehrlichiosis Monocítica Canina (CME), una enfermedad emergente en la medicina veterinaria. CME es una enfermedad mundial transmitida por la mordedura de la garrapata. El vector transmisor de CME es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (*Ixodidae*) (6). CME es un trastorno de fases múltiples que progresa en tres etapas: aguda, subclínica, y crónica. Cada fase se caracteriza por varias anormalidades clínicas y hematológicas (6). La infección por *E. canis* causa la enfermedad más grave en los perros y puede resultar en fiebre, mialgia, depresión, reducción de las células blancas y la trombocitopenia; que puede conducir a trastornos de la coagulación, particularmente hemorragias (7). La trombocitopenia se observa en el 84% de los perros infectados y se utiliza como un indicador para el tratamiento antibiótico (6,7). CME es la enfermedad transmitidas por garrapatas común en el perro en Estado Unidos y los países latinoamericanos, presentándose en con mayor frecuencia durante los meses de clima cálido, cercanos al patrón de mayor actividad de las garrapatas.

En México, la epidemiología y distribución geográfica de CME no se conoce bien, y se han reportado varias frecuencias de infección desde 2009 en todo el país, que van desde el 74,5% (8), 44,1% (9) y 33% (10), mostrando frecuencias más altas que otros países de América Latina. La epidemiología de *E. canis* refleja la distribución geográfica y actividades del vector (*R. sanguineus*) y reservorios, tales como domésticos (perros) y los mamíferos silvestres (ratones del bosque; *Neotoma*) (8-11). Las variaciones climáticas incluyendo fenómenos meteorológicos extremos (cambios en la temperatura, humedad y lluvia) y su frecuencia, tienen un impacto profundo en las enfermedades infecciosas y sus organismos vectores asociados, como los mosquitos, garrapatas y especies de *Triatoma* (12). Los brotes de enfermedades transmitidas por vectores también dependen de muchos otros factores que interactúan, como la dinámica de las poblaciones humanas y animales, cambios agrícolas, deforestación y la construcción de presas, que en conjunto provocan la pérdida de la biodiversidad (13). Frente a los cambios ambientales, los organismos vivos tienen tres opciones:

adaptarse a las nuevas condiciones, emigrar a un hábitat más apropiado, o extinguirse (14). Varios otros factores pueden influir en la distribución de los vectores y reservorios, tanto en condiciones ambientales presentes o futuras. Estos factores pueden ser bióticos (interacciones entre especies), geográficas (capacidad de dispersión, la capacidad evolutiva de las poblaciones de especies para adaptarse a la nueva condición) y antropogénica (cambios en el uso de suelos, y manejo de los animales) (7, 15).

La asociación entre enfermedades tiempo/clima entra en tres categorías: espacial, con el clima afectando a la distribución de las enfermedades; temporal, el tiempo o el clima afecta a la sincronización de los brotes; y la relacionado con la intensidad de un brote (16). Las variables climáticas como la temperatura y precipitación, afectan la distribución del hábitat de las garrapatas. En consecuencia, un aumento de temperatura debido al cambio climático tiene un efecto directo sobre los hábitos de alimentación y comportamiento del vector, lo que puede alterar el equilibrio entre la vida útil de un vector infectado, su frecuencia de la alimentación, y el tiempo necesario para la maduración del patógeno dentro de ella (17).

La estrecha relación entre los patógenos y sus vectores, hace que los patógenos susceptibles a los factores abióticos que afectan a la biología de las garrapatas. La garrapata *R. sanguineus* parasita perros y una gama de varios animales silvestres y domésticos, así como los seres humanos. Además, es un vector competente de varios patógenos de importancia médica y veterinaria (*R. rickettsii*, *Babesia vogeli* y *Hepatozoon canis*). Esta especie de garrapata se adapta bien a los ambientes rurales y urbanos, su distribución está influenciada por la temperatura, humedad y disponibilidad del hospedero (11,18).

Las enfermedades transmitidas por vector, se pueden modelar con gran precisión predictiva mediante el uso de métodos de distribución de las especies, que se asocian con factores ambientales. Este tipo de estudios podría analizar por separado la distribución potencial de hábitat para cada especie de garrapata (19), que a su vez se utilizarán como herramienta para controlar/prevenir a las garrapatas.

El objetivo de este estudio fue explorar la distribución potencial presente y futura de *R. sanguineus* en México, utilizando un enfoque de máxima entropía. Nuestros resultados mostraron que los datos de distribución de una especie colectada a través de trabajo de campo, y la base de datos, predice la distribución potencial presente y futura del hábitat adecuado de las especies de garrapatas. *Rhipicephalus sanguineus* es el candidato más indicado para la transmisión (vector competente) de CME en México, y se ha demostrado que es un vector competente para múltiples Rickettsiosis transmitidas por garrapatas en condiciones de cambio climático.

### **Material y métodos**

**Área de estudio y los datos geográficos.** El área de estudio incluye a México y fue delimitada por las coordenadas 14 ° 32'27" - 32 ° 43'06" N y 86 ° 42'36" - 118 ° 27'24" W. (Figura 1). Para efectos de modelado, los datos de distribución (longitud y latitud) de *Rhipicephalus sanguineus* se reunieron a partir de bases de datos ya existentes (GBIF.org, último acceso 09 de julio de 2015) y previamente publicados (8,21). Un total de 384 garrapatas en 130 lugares únicos fueron utilizadas para construir el modelo de *Rhipicephalus sanguineus* (tabla 1).

**Métodos de modelación y evaluación.** Construimos diferentes conjuntos de modelos de distribución de especies, para la construcción de los modelos se tomo en base la presencia de la garrapata utilizando un algoritmo de máxima entropía (MaxEnt) (22,23). MaxEnt ha demostrado ser robusto para la construcción del modelo de datos

Se utilizó la versión MaxEnt k 3.3.3 (<http://www.cs.princeton.edu/schapiire/maxent/>) con los parámetros estandarizados (umbral de convergencia = 105, iteraciones máximo = 500, valor regularización  $\beta$  = auto) (24). Para cada modelo, la relación de la prueba de entrenamiento se establece en 30:70, lo que significa que los modelos se construyeron utilizando el 70% de los datos y probados con el 30% restante, el modelo fue repetido diez veces.

**Figura 1.** Distribución geográfica de las garrapatas utilizadas para la construcción de los modelos.



Para evaluar los modelos se calculó para el área bajo la curva (AUC) de las características de funcionamiento del receptor parcelas (ROC) (25). ROC es una medida del umbral independiente que evalúa la sensibilidad frente a la especificidad de un modelo cuando se presenta con un nuevo dato.

Un gráfico ROC se obtiene mediante el trazado de todos los valores de sensibilidad en el eje y contra de sus valores equivalentes (1-especificidad) para todos los umbrales de decisión disponibles en el eje  $x$ . El resultado teóricamente perfecto es  $AUC = 1$ , mientras que la realización de una prueba no es mejor que el rendimiento de azar  $AUC = 0.5$ . Las AUC se calcularon en MaxEnt. Se corrió diez veces el modelo en MaxEnt de cada especie de garrapata; los datos de las AUC. Los resultados del modelo se procesaron y visualizaron utilizando en el software ArcGIS 10.

**Cuadro 1.** Estados, localidades y número de *R. sanguineus* colectadas en México, para construir el modelo.

State	Localities	<i>R. sanguineus</i>
Mexico City	6	32
Edo. Mexico	4	13
Morelos	2	15
Puebla	4	24
Hidalgo	3	9
Baja California	1	4
Sonora	2	9
Sinaloa	49	134
Nayarit	4	8
Jalisco	2	5
Michoacan	11	15
Guerrero	6	32
Oaxaca	3	17
Chiapas	3	12
Durango	5	3
Nuevo Leon	12	13
Tamaulipas	6	18
Veracruz	4	9
Tabasco	1	6
Guanajuato	2	6
Total	130	384

**Variables climáticas.** Se utilizaron diecinueve variables climáticas, como variables exploratorias ([www.worldlim.org](http://www.worldlim.org)) para construir los modelos (26). Estas variables climáticas tienen una resolución de aproximadamente 1x1km<sup>2</sup> por celda de la cuadrícula (<http://www.worldclimatic.org/>; último acceso 27 de marzo 2014). Para evitar el uso de variables altamente correlacionadas, nos encontramos con un análisis de correlaciones, y eliminamos una de las variables de cada par con un valor de correlación de Pearson > 0.8 (Tabla 2).

**Proyección bajo escenarios futuros.** Se desarrollaron modelos de distribución futura para el año 2050, utilizando dos escenarios propuestos por el Informe Especial de Escenarios de Emisiones (IE-EE) del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC): A2 (que propone un crecimiento demográfico humano continuo y un grave aumento de las emisiones de gases) y B2 (que propone un menor crecimiento demográfico humano que A2, y las emisiones de gases más sostenibles) (15). Existen diferentes modelos circulatorios globales (GCM) y no se puede considerar uno u otro superior,

seleccionamos cuatro diferentes GCM para comparar los resultados: CCCMA (Centro Canadiense para Climático Modelación y Análisis, Canadá), CSIRO (Commonwealth Investigación Científica e Industrial Organización atmosférica modelos de investigación, Australia), HADCM3 (Centro Hadley para la Predicción Climática e Investigación / Met, Reino Unido) y NIES99 (Instituto Nacional de Estudios Ambientales, Japón).

**Hábitat estable adecuado.** Se estimó un " hábitat estable" teniendo en cuenta los mapas actuales y futuros de las garrapatas infectadas. En primer lugar, reclasificamos los modelos de distribución potencial para el presente y futuro, para obtener mapas binarios (presencia = 1, la ausencia = 0) con el "umbral mínimo presencia" (24,25,1,2,3,15). Este umbral incluye predicciones de hábitats adecuados por todo los lugares donde hemos colectado garrapatas. La comparación de las proyecciones actuales y futuras se calculó utilizando la fórmula ((futura pérdida de ganancia futura) \* 100 / presente área).

## Resultados

El AUC para los datos de entrenamiento y datos de prueba se muestran en la Tabla 3. Entre las 19 variables utilizadas, BIO 03 (isotérmica), BIO 04 (estacionalidad de la temperatura), BIO 12 (precipitación anual) y BIO 18 (precipitación del trimestre más cálido), presentaron la mayor contribución para la construcción de los posibles modelos de distribución de hábitats adecuados (75%) de la garrapatas *R. sanguineus*.

**Modelos construidos para la distribución potencial presente y futuro del vector competente.** A nivel de especies, en la figura 2 se muestran mapas de distribución actual del hábitat estable adecuado para *R. sanguineus*. La superficie total se estima en 332,821 km<sup>2</sup>. Los modelos de distribución presente y futuro del hábitat de *R. sanguineus* construido por MaxEnt se muestran en las figuras 3 y 4, respectivamente. Nuestras proyecciones estiman que las garrapatas *R. sanguineus* podrían cambiar su hábitat adecuado, aumentando a 36%. Estos cambios, sugieren una expansión del hábitat adecuado hacia las zonas del Centro y Norte de México. La tabla 4 muestra la pérdida, y ganancia del hábitat estable .

**Cuadro 2.** Variables explicatorias usadas para la construcción del modelo.

Variable	Explanation	Used to construct the <i>R. sanguineus</i> model
BIO 01	Annual mean temperature	
BIO 02	Mean diurnal range	
BIO 03	Isothermal	X
BIO 04	Temperature seasonality	
BIO 05	Maximum temperature of warmest month	
BIO 06	Minimum temperature of coldest month	
BIO 07	Temperature annual range	X
BIO 08	Mean temperature of wettest quarter	
BIO 09	Mean temperature driest quarter	
BIO 10	Mean temperature of warmest quarter	
BIO 11	Mean temperature of coldest quarter	
BIO 12	Annual precipitation	X
BIO 13	Precipitation of wettest month	
BIO 14	Precipitation of driest month	
BIO 15	Precipitation seasonality	X
BIO 16	Precipitation of wettest quarter	
BIO 17	Precipitation of driest quarter	X
BIO 18	Precipitation of warmest quarter	X
BIO 19	Precipitation of coldest quarter	

**Cuadro 3.** Valores del Área bajo la curva (AUC) después de MaxEnt.

Species	Training Data	St. Dev	Test Data	St. Dev
<i>R. sanguineus</i>	0.986	0.022	0.973	0.071

## Discusión

A nuestro entender, se presenta la primera distribución potencial del hábitat para *E. canis* en el vector competente bajo las condiciones de cambio climático en México. Los datos incluyen información sobre el vector competente (*Rhipicephalus sanguineus*), y sugieren un cambio en la distribución del vector infectado de *E. canis*. Además, proporciona una evaluación cualitativa y cuantitativa de las futuras áreas climáticamente adecuadas para *E. canis* en el país.

Los vectores se ven afectados en su mayor parte en el Noreste del país, seguido por la disminución prevista en el hábitat debido a la escasez de lluvias y las altas temperaturas. La situación se invierte en el sureste de México, proyectada a futuro para el año 2050, influenciada principalmente por las precipitaciones.

El aumento de la temperatura, que se ha predicho que se produzca en los próximos años, podría afectar drásticamente la ecología y distribución geográfica de la CME en México, en particular las causadas por patógenos Rickettsiales. El



cambio climático se ha demostrado afecta a la actividad y alimentación de las garrapatas en diferentes etapas de la vida (16).

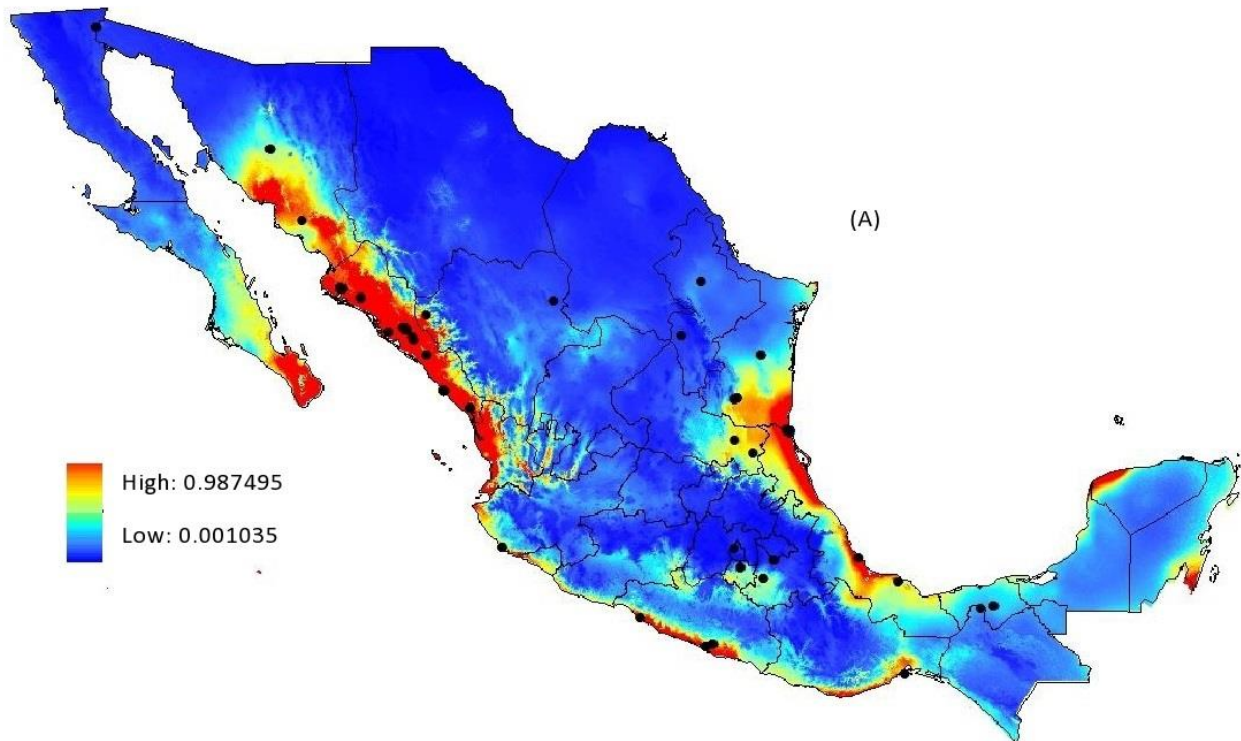
**Figura 2. Distribución del hábitat considerado estable de la garrapata competente *R. sanguineus*.**



Una temperatura más alta resultante del cambio climático, puede aumentar la tasa de desarrollo de ciertos patógenos, que tienen una o más etapas del ciclo de vida fuera de su huésped humano o animal. Esto puede reducir los tiempos de generación, y posiblemente aumentar el total de número de generaciones por año, lo que lleva a mayores patógenos en las poblaciones. En contraste, los patógenos sensibles a las altas temperaturas y su supervivencia puede disminuir con el calentamiento climático (16,27). El comportamiento de las garrapatas y los hospederos, son un factor importante en la distribución y dispersión de las garrapatas, que tiene un movimiento independiente limitado. El movimiento incluye la invasión a nuevas regiones. La alta densidad de población y las diversas comunidades de aumentan la probabilidad de ser recogido por un huésped adecuado, lo que podría ser una razón para la asociación predominante de muchas especies de larvas de garrapatas duras y ninfas con pequeños mamíferos

(28). Así, la inclusión de distribución de los huéspedes debe ser incluido en un estudio más exhaustivo.

**Figura 3 Distribución del hábitat para *R. sanguineus* obtenido mediante maximum-entropía, utilizando las localidades registradas.** Distribución presente de *R. sanguineus*. Rojo= Alto suitable habitat vs. azul= no suitable habitat.



Los resultados de máxima entropía encontraron que las altas temperaturas son una influencia para el hábitat estable adecuado de las especies de garrapatas se incrementará. Hemos demostrado que un aumento de la temperatura y las precipitaciones son correlacionados con un aumento potencial de la distribución potencial hábitat adecuada de *R. sanguineus*; como cambio de hábitat adecuado para la distribución de las especies que podría ocurrir en México.

Se demuestra que los modelos de distribución futura de los hábitats adecuados para *R. sanguineus* pueden presentar diferencias al evaluar el rango de distribución vectores, y una extensión en el noroeste y sureste de la distribución de los vectores competentes.

Se ha demostrado previamente que bajo temperaturas altas a lo establecido, *R. sanguineus* que se alimentan preferentemente en perros, podría morder a los seres humanos y provocar enfermedades zoonóticas de transmisión (18). En México, algunos informe mostraron que se tiene un frecuencia de infección en ratones de 9,8% a *Ehrlichia canis*, y están presentes en el centro y sur de México (29).

También perros y garrapatas infectados, reportadas con una tasa del 74% al 33% desde el norte y sureste, respectivamente (8-10). Para el modelo de distribución del habitat futuro, modelo NIES99 presentó una AUC de > 0,90, el más alto de todos los modelos analizados.

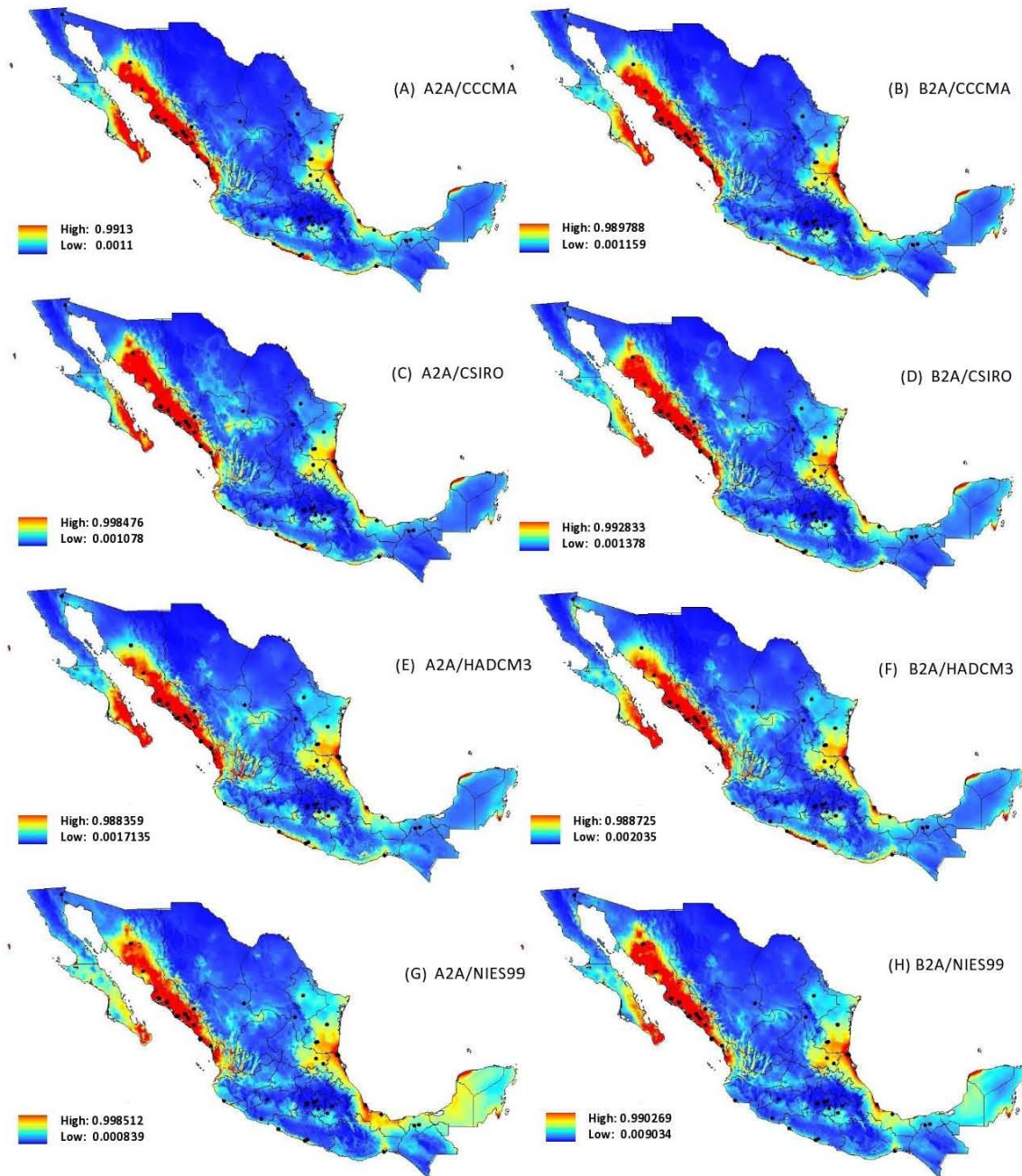
La ganancia de *R. sanguineus* en modelos de proyección futura en el hábitat sustentable parece estar influenciado por el aumento de la temperatura y las precipitaciones (BIO 04 y BIO 07). Las regiones más cálidas podrían ser aún más caliente y sin embargo seguir siendo permisiva para los vectores si también hay aumento de las precipitaciones y/o humedad. La correlación entre cada una de estas variables ambientales y la posibilidad de que la presencia de *R. sanguineus* confirma la estrecha relación de esta especie a la precipitación y la temperatura. Estos resultados corresponden con el hecho de que *R. sanguineus* puede sobrevivir en temperaturas extremas y humedad, que muestra una distribución por ambas partes del país; el Océano Pacífico y el Golfo de México.

Nuestros resultados predicen que puede haber cambios de rango como resultado del cambio climático para *E. canis* en el vector, estableciendo así nuevas áreas potenciales para la distribución de CME en México.

## **Conclusión**

Los modelos presentados aquí muestran un cambio potencial en la distribución de las especies de vectores competentes de *E. canis* en México. Los modelos de distribución potencial han demostrado ser una herramienta útil y rápida para entender la ecología y distribución de *E. canis*. Las estrategias de control también deben investigarse más a fondo, como parte de la capacidad de adaptación al cambio climático.

**Figura 4 Distribución futura (2050) del hábitat de *R. sanguineus* obtenido con máxima-entropía (A) A2A/CCCMA; (B) B2A/CCCMA; (C) A2A/CSIRO; (D) B2A/CSIRO; (E) A2A/HADCM3; (G) B2A/HADCM3; (H) A2A/NIES99; (I) B2A/NIES99. Rojo= alto suitable hábitat vs. Azul= no suitable hábitat.**



Los brotes de enfermedades transmitidas por vectores también dependen de muchos otros factores que interactúan como las poblaciones animales, la ruptura de la infraestructura de salud pública, los cambios en el uso del suelo (13).

### **Lista de abreviaciones**

CME	Canine Monocytic Ehrlichiosis
CCCMA	Canadian Centre for Climate Modelling and Analysis
CSIRO	Commonwealth Scientific and Industrial Research organization Atmospheric Research
HADCM3	Hadley Centre for Climatic Prediction and Research
NIES99	National Institute for Environmental Studies
IPCC	Inter-governmental Panel on Climatic Change
A2	Scenario that proposes a continuous human demographic growth and a severe increase of gas emissions.
B2	Scenario that proposes lower human demographic growth than A2, and more sustainable gas emissions.
<i>E. canis</i>	<i>Ehrlichia canis</i>
MaxEnt	Maximal Entropy
AUC	Area Under the Curve
ROC	Receiver Operating Characteristics plots
SRES	Special Report of Emission Scenarios
GCM	Global Circulation Model
BIO	Bioclimate variables
TBRD	Tick-borne Rickettsial Diseases

### **Declaratoria de intereses**

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

### **Contribución de los autores**

CGSG, TPFA, MGGP contribuyeron a la concepción, diseño, colección de datos, trabajo de laboratorio, análisis de datos y escrito de manuscrito. MVS contribuyó a la colecta de datos, trabajo de laboratorio, y escrito. MDEG, JT contribuyeron al análisis de los datos, redacción y escrito. Todos los autores han leído y aprobado el manuscrito final.

## Referencias

1. Yabsley MJ, Winberly MC, Stallknecht DE, Little S E, Davidson WR. (2005) Spatial analysis of the distribution of *Ehrlichia chaffeensis*, causative agent of Human Monocytotropic Ehrlichiosis, across a multi-state region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 72(6): 840-850.
2. Illoldi-Rangel P, Rivaldi CL, Sissel B, Trout RF, Gordillo-Perez G, Rodriguez-Moreno A, Williamsson P, Montiel-Parra G, Sanchez-Cordero V, Sarkar S (2012) Species distribution models and ecological suitability analysis for potential tick vectors of Lyme diseases in Mexico. *J Tropical Medicine*. ID. 959101.
3. Feria-Arroyo TP, Castro-Arellano I, Gordillo-Perez G, Cavazos AL, Vargas-Sandoval M, Grover A, Torres J, Medina RF, Perez de León A, Esteve-Gassent MD (2014) Implications of climate change on the distribution of the tick vector *Ixodes scapularis* and risk for Lyme diseases in the Texas-Mexico transboundary region. *Parasites & Vectors*. 7:199.
4. Rikihisa Y (1991) The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 4(3): 286–308.
5. Unver A, Perez M, Orellana N, Huang H, Rikihisa Y (2001) Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(8).2788–2793.
6. Waner T, Harrus S. (2004) Ehrlichiosis monocytic canine. In: Carmichael L (Ed.), *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*.
7. Nicholson WL, Allen KE, McQuiston JH, Breitschwerdt EB, Little S (2010) The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends in Parasitology*. 26 (4).206-212.
8. Sosa-Gutierrez CG, Quintero Martinez MT, Gaxiola-Camacho SM, Cota-Guajardo S, Esteve-Gassent MD, Gordillo-Pérez MG (2013) Frequency and Clinical Epidemiology of Canine Monocytic Ehrlichiosis in Dogs Infested with Ticks from Sinaloa, Mexico. *Journal of Veterinary Medicine*, vol. 2013, Article ID 797019, 3 pages, 2013. doi:10.1155/2013/797019.

9. Rodriguez-Vivas RI, Albornoz Bolio GME (2005) *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: Seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Veterinary Parasitology* 127(1):75–79.
10. Nuñez OL (2003) Estudio de la seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en México. *Revista AMMVEPE* 14 (3): 83–85.
11. Lorusso V, Dantas-Torres F, Lia RP, Tarallo VD, Mencke N, Capelli G, Otranto D (2010) Seasonal dynamics of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*, on a confined dog population in Italy. *Medical and Veterinary Entomology*. 24:309-315.
12. Patz JA, Campbell-Lendrum D, Holloway T, Foley JA (2005) Impact of regional climate change on human health. *Nature*. 438: 310-317.
13. Haines A, Patz JA (2004) Health Effects of climate Change. *Journal of American Medical Association*. 291 (1): 99-103.
14. Léger E, Vourc'h G, Vial L, Chevillon C, McCoy KD (2013) Changing distribution of ticks: causes and consequences. *Exp Appl Acarol* 59: 219-244.
15. Garza M, Feria-Arroyo TP, Casillas EA, Sanchez-Cordero V, Rivaldi CL, Sarkar S (2014) Projected future distributions of vectors of *Trypanosoma cruzi* in North America under climate change scenarios. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8(5):e2818.
16. Baylis M, Risley C (2013) In: Kink P, Grimes DJ (Eds). *Infectious diseases, climate change effects on*. In: *Infectious Diseases: selected entries from the Encyclopedia of sustainability science and technology*. New York: Springer Science. pp 117-146.
17. Dorwell SF (2001) Seasonal variation in host susceptibility and cycles of certain infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 7:369-374.
18. Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier PE, Sotou A, Labauge P, Raoult D. (2008) Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe Rickettsioses. *Neglected Tropical Diseases*. 2(11):e338.
19. Barret MA, Brown JL, Junge RE, Yoder AD (2013) Climate change, predictive modeling and lemur health: Assessing impacts of changing climate on health and conservation in Madagascar. *Biological Conservation*. 157: 409-422.

20. Eisen RJ, Eisen L (2008) Spatial modeling of human risk exposure of vector-borne pathogens based on epidemiological versus arthropod vector data. *J Med Entomol* 45(2): 181-192.
21. Sosa-Gutiérrez CG, Vargas-Sandoval M, Torres J, Gordillo-Pérez MG (2013) Frequency of *Ehrlichia* spp in ticks from Mexico. In: Petnicki-Ocwieja T, Brissette CA (eds) 13<sup>th</sup> International Conference of Lyme Borreliosis and Other Tick-Borne Diseases. Frontiers Abstract Book, USA.
22. Phillips SJ, Anderson RP, Schapiro RP (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol Model* 190(3-4):231-259.
23. Elith J, Phillips SJ, Hastie T, Dudik M, Chee YE, Yates CJ (2011) A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Divers Distrib*. 17(1): 43-57.
24. Phillips SJ, Dudik M (2008) Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Echography* 31(2): 161-175.
25. Fielding HA, Bell JF (1990) A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environ Conserv*, 24:38-49.
26. IPCC: Summary for Policymakers (2007) In: Climate change: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Edited by Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Avery KB, Tignor M, Miller HL. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: 2007. [http://www.ipcc.ch/publications\\_and\\_data/ar4/wg1/en/contents.html](http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/wg1/en/contents.html).
27. Manangan JS, Schweitzer SH, Nibbelink N, Yabsley MJ, Gibbs SEJ, Wimberly MC (2007) Habitat factors influencing distributions of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis* in the Mississippi alluvial Valley. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 7(4). DOI: 10.1089/vbz.2007.0116.
28. Pfaffle M, Littwin N, Murders S V, Petney T N (2013) The ecology of tick-borne diseases. *Int J of Parasitology* 43: 1059-1077.
29. Sosa-Gutiérrez CG, Vargas M, Torres J, Gordillo-Pérez, MG (2014) Tick Borne Rickettsial Pathogens in Rodents from Mexico. *J Biome Sci Engi* 7:884-889.



30. Atkinson SF, Sarkar S, Aviña A, Schuermann JA, Williamson P (2012) Modelling spatial concordance between Rocky Mountain spotted fever disease incidence and habitat probability of its vector *Dermacentor variabilis* (American dog tick). *Geospatial Health* 7(1): 91-100.

## VIII. DISCUSION

Las garrapatas fueron los primeros artrópodos en establecerse como vectores de patógenos, y subsecuentemente los mosquitos; ambos, como los mejores artrópodos vectores de enfermedades en el humano y animales domésticos alrededor del mundo. Estas constituyen un grupo diverso con al menos 898 especies reconocidas de especies, distribuidas en tres familias: Argasidae (194 spp.), Ixodidae (703 spp.), y Nuttalliellidae (1 sp.). Los parásitos de una amplia variedad de animales, incluyendo los seres humanos, que son huéspedes accidentales para varias especies de garrapatas, como la garrapata estrella solitaria *Amblyomma americanum*, *I. ricinus* y *R. sanguineus*.

En los últimos 40 años, han sido identificados más de 50 patógenos emergentes y reemergentes. Término que se acuñó en 1992 cuando el Instituto de Medicina emitió un reporte que definió a las enfermedades infecciosas emergentes; sin embargo, la medicina ha sido complaciente con este tipo de enfermedades infecciosas a pesar de las señales de alarma que han provocado infecciones graves al humano. Las herramientas moleculares han sido utilizadas para el descubrimiento y caracterización de virus y bacterias emergentes. La factibilidad de aplicar estas herramientas diagnósticas a los agentes patógenos de mayor peligro, fastidiosos o difíciles de cultivar con pruebas convencionales que limitan un diagnóstico oportuno; ha dado suficientes pruebas para cambiar el concepto de manejo para muchos agentes<sup>57</sup>.

La distribución de estas enfermedades está relacionada con la distribución del vector. Su presencia se ha reportado en Asia, África, Europa y América. Entre 1984 y 2009, nueve especies o subespecies de rickettsias fueron identificadas como agentes emergentes transmitidos por garrapatas alrededor del mundo. Seis de estas especies han sido aislados de garrapatas y años después en humanos provocando la enfermedad. La presencia de los agentes patógenos en el vector es un indicador de riesgo de exposición de la población a esas zonas<sup>1,2,3,58</sup>.

El riesgo de transmisión de los agentes patógenos del vector a los reservorios y al humano se ha incrementado debido a las actividades recreativas durante las estaciones de mayor actividad de las garrapatas (abril – septiembre), además de la introducción de zonas residenciales a zonas urbanas zonas rurales o boscosas donde la población se integra a regiones con mayor exposición y riesgo de ser mordidos por garrapatas infectadas<sup>58,59,63</sup>.

Ehrlichiosis monocítica humana, Anaplasmosis Granulocítica humana y Ehrlichiosis monocítica canina no son consideradas enfermedades endémicas o de su existencia en México, a excepción de Rickettsiosis, que presenta datos desde los años 20's. El estudiar la presencia de TBRD en zonas consideradas no endémicas o libres de patógenos, sus vectores, y reservorios tanto en pacientes como en animales; nos lleva al conocimiento real de la ecología de estas enfermedades zoonóticas emergentes, y determinar su verdadero impacto en el comportamiento para la transmisión<sup>53,38</sup>.

Los animales silvestres puede servir como reservorios o huéspedes amplificadores de varios patógenos humanos; la gran mayoría de TBRD están de animales silvestres reservorios. Sin embargo, los agentes patógenos transmitidos por garrapatas tradicionalmente asociado con la enfermedad en aves domésticas los animales también pueden eventualmente surgir como patógenos humanos. Por ejemplo, *Ehrlichia canis* ha sido implicado en algunos casos humanos de Venezuela, y una nueva cepa de *E. canis* ha sido detectado en perros de Perú. La evidencia serológica de infección por *Ehrlichia* en los seres humanos se ha reportado en América del Sur, pero no se cuenta con herramientas moleculares sobre las especies de *Ehrlichia* infectan a los seres humanos en esta región<sup>58</sup>.

La proyección o el estudio de las garrapatas y las bacterias portadoras ha provisto de muchas asociaciones. Estos nuevos hallazgos contribuyen al conocimiento de la distribución de zonas endémicas de estos patógenos; ya que algunos patógenos transmitidos por vector presentan un peligro y por ende un alto riesgo para la población humana. La habilidad de las garrapatas de actuar como vectores competentes para varios patógenos es peligrosa y tiene que ser considerada para el tratamiento del paciente<sup>63</sup>. El estudio y continuo monitoreo, jugará un papel

importante en la Salud Pública para valorar el riesgo de adquisición de alguna enfermedad transmitida por vector<sup>58</sup>. Cinco especies de Ehrlichia y Anaplasmas son conocidas por su importancia médica y veterinaria: *E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum*, *E. muris*, *E. enwingii* y recientemente, *E. canis*; los cuales provocan una infección persistente en sus hospederos naturales, y en algunos hospederos accidentales que pueden causar un shock toxico. Pero aún, es desconocida la proporción en que esta enfermedad se convierte en persistente o crónica para el humano. La distribución geográfica de animales reservorios, vectores y humanos expuestos a TBRD en México era desconocida<sup>58,63</sup>.

El comportamiento humano (por ejemplo, el sentarse en los registros del agua, la recopilación de madera, sentado contra árboles, y caminar) podrían aumentar el riesgo de exposición a garrapata. Por ejemplo, las personas que visitan las zonas boscosas podrían estar expuestas a las garrapatas duras, mientras que las personas que entran a cuevas infestadas de garrapatas y madrigueras pueden estar expuestas a las garrapatas blandas. Especies de garrapatas que se encuentran en los seres humanos puede variar de una región a otra. En Sudamérica, aproximadamente 30 especies de garrapatas se han encontrado en los seres humanos. La mayoría de los casos de infestación en humanos de esta región, están relacionados con garrapatas *Amblyomma*, que se asocian con frecuencia con la fauna silvestre. Algunas de estas especies *Amblyomma* se han asociado como vectores de rickettsias, tales como *R. rickettsii* y *R. parkeri*. Hasta hace poco, el parasitismo humana por *R. sanguineus* fue considerada rara en Sudamérica. Sin embargo, un estudio reciente llevado a cabo en el norte de Brasil informó de varios casos de parasitosis humana por esta garrapata, lo que puede sugerir un alto nivel de infestación del medio ambiente<sup>52</sup>. Estudios recientes han demostrado que la diversidad real de garrapatas puedan infestar seres humanos es mayor que previamente creído. Por ejemplo, un estudio llevado a cabo en una sola Provincia turca reveló la presencia de 24 especies de garrapatas en los seres humanos, aunque sólo 800 de 5,999 garrapatas colectadas fueron identificados a nivel de especie. Del mismo modo, 26 garrapatas se identificaron las especies entre las 2,528 garrapatas colectadas de los seres humanos en varios distritos de

Amasya, otra provincia de Turquía, donde la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo es endémica<sup>32</sup>. La importancia médica sobre el parasitismo por algunas de estas especies de garrapata es desconocido, pero cualquier caso de infestación humana por las garrapatas debería ser considerada de importancia clínica. Las garrapatas se deben preservar para la identificación, que a su vez podría ofrecer a los médicos y veterinarios información sobre el riesgo potencial de su salud y los pacientes pueden estar expuestos a las garrapatas que pueden vivir en muchos tipos de ambientes. Por ejemplo, la mayoría de las especies de garrapatas blandas asociados a la enfermedades transmitidas por artrópodos son típicamente encontrado en cuevas, mientras que las garrapatas de los mamíferos terrestres salvajes se encuentran comúnmente en las zonas forestales. Los animales (por ejemplo, el ganado y los perros) pueden traer garrapatas infectadas por patógenos y también representan un riesgo para los seres humanos<sup>1,26,29,32,58</sup>.

Este estudio provee datos sobre la frecuencia de *R. rickettsii*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* y *E. chaffeensis* en los roedores como huésped<sup>2,26</sup> y las especies de *Peromyscus* fueron la de mayor prevalencia para todas los patógenos TBRD examinados, como se muestra en otros estudios con la misma frecuencia de infección con Ehrlichia y Anaplasma spp.<sup>57</sup> que generalmente han sido observadas solo en una grupo definido de huéspedes, incluyendo roedores y grandes mamíferos; nuestro estudio sugiere que Ehrlichia spp y Anaplasma spp; pueden ser transmitidas por una gran variedad de hospederos en la naturaleza<sup>13</sup>. Estos datos también proveen una oportunidad para examinar la ecología de las enfermedades zoonóticas con diferentes factores para que la transmisión se realice<sup>52</sup>.

Todas estas enfermedades son relativamente nuevas en los humanos, los factores que la incluyen son el cambio de uso de suelo, métodos en la agricultura, zonas residenciales en áreas de bosques, y la falta de control en el vector; sin embargo, estas enfermedades pueden ser transmitidas al humanos, de pequeños mamíferos como los roedores que están en continua circulación en la naturaleza en muchas partes del país<sup>24,50</sup>. Los cambios medioambientales pueden potencializar y alterar

a distribución de los mamíferos y artrópodos y hacer que se transmita al humanos<sup>59</sup>.

Estos resultados demuestran que los roedores capturados en los diferentes sitios de México, están infectados con *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Rickettsia* spp.; sin embargo, la infección con las especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma*, habían sido generalmente observadas solo en un rango definido de huéspedes, incluyendo roedores y algunos grandes mamíferos, por lo que sugiere que diferentes especies de *Anaplasma* y *Ehrlichia* pueden ser transmitidos por una variedad de hospederos en la naturaleza<sup>60,62</sup>.

Hasta ahora no se tenía noción de casos clínicos provocados por *A. phagocytophilum*, y solo uno de *E. chaffeensis* en México, en comparación con muchos reportes de caso alrededor del mundo<sup>34</sup>. Debido a estos, es importante conocer si la distribución del roedor positivo a algún patógeno TBDR coincide en su área a probable casos humanos y/o que los humanos puedan adquirir alguna de estas enfermedades<sup>60</sup>.

Este estudio provee la frecuencia de *R. rickettsii*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* y *E. chaffeensis* transmitida por garrapatas. Acorde a la especie-específico de las garrapatas en el medio ambiente, las garrapatas Ixodidae los géneros *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Ixodes* y *Amblyomma* son los más importantes vectores de las especies de Rickettsiales; incluyendo a los patógenos Rickettsiales de alto riesgo para el hombre<sup>2</sup>; y en los Estados Unidos *Ixodes scapularis* e *I. pacificus*, han sido asociadas con *A. phagocytophilum* como su principal vector<sup>2,34</sup>. México está confirmado como una zona endémica de la Enfermedad de Lyme en el noreste y centro del país; ya que fueron identificados casos clínicos, así como la distribución del vector y hospederos infectados con *B. burgdorferi*<sup>8</sup>. Y con esto, el panorama se crece, debido a la coinfección que pudiera estar presente ya que la posibilidad de que dos o más patógenos puedan coexistir en un mismo vector es alta<sup>34</sup>.

*A. phagocytophilum* fue el agente más frecuente, seguido de *E. canis*. En un estado del noreste de México<sup>61</sup> encontraron un 50% de garrapatas positivas a *Rickettsia* spp. un resultado muy alto en comparación a la frecuencia en este

estudio de *R. rickettsii*, 2.1% (10/477); además ellos solo encontraron diferentes especies de *Amblyomma*, y en el presente se colectaron más de once géneros de garrapatas.

La distribución geográfica de estas enfermedades está relacionada íntimamente con la distribución del vector<sup>1</sup>; estos hallazgos proveen la distribución y posible endenmicidad de estos agentes patógenos. Se detectaron diversos grupos de especies de garrapatas y microorganismos; donde se identificaron nuevas asociaciones en México: *A. phagocytophilum* en *A. cajennense*, *A. dissimile*, *A. maculatum*, y *D. variabilis*; *E. canis* en *A. cajennense*, *A. dissimile*, *A. maculatum*, *D. variabilis*, *I. scapularis* y *H. leporispalustris*; *R. rickettsii* en *A. cajennense*, y *D. nitens*; y *E. chaffeensis* en *A. cajennense*. Mexico realizaron un modelo de distribución para *A. cajennense* y el grupo *Ixodes* para predecir áreas de posible endenmicidad para *Borrelia burgdorferi* en México. El grupo *Ixodes* fue predecible estar presente en todos los estados de México, mientras que *A. cajennense* es predecible para todos los estados del centro de México<sup>8,63</sup>.

Por otro lado; *R. sanguineus* es considerada una garrapata de distribución mundial y capaz de transmitir patógenos como *R. rickettsii*, especies de *Ehrlichia*, especies de *Anaplasma*, *Coxiella burnetii* y *Leishmania infantum*<sup>13,55</sup>. *R. sanguineus* fue la garrapata más frecuente en este estudio, alrededor de 52.2% de todas las garrapatas examinadas, similar a lo reportado en Italia<sup>34</sup>; y con mayor frecuencia de infección de todos los patógenos. La presencia de estos patógenos estuvo prevalente en todas las estaciones del año, aunque en verano se presenta la mayor frecuencia, diferente a lo reportado en Korea<sup>60</sup>; encontraron en otoño la mayor frecuencia de especies de *Ehrlichia/Anaplasma* en garrapatas; aunque la coinfección reportada fue similar a lo reportado en este estudio.

Estudios sobre estos microorganismos en garrapatas en zonas consideradas no endémicas pueden proveer información sobre la patogenicidad potencial de estas bacterias, sus vectores, y reservorios. Estos datos pueden proveer la oportunidad de examinar la ecología de la zoonosis emergente para lo cual están diferentes factores ecológicos están presentes<sup>52</sup>.

Las garrapatas Ixodes no son capaces de sobrevivir por mucho tiempo, aunque algunos adultos pueden persistir sin comer por un año o más; pero también su capacidad de sobrevivir está ligada a factores como la temperatura, humedad relativa, y la infección por algunos patógenos; algunos estudios han demostrado la habilidad de la garrapata *R. sanguineus* de sobrevivir en la naturaleza todo el año<sup>9</sup>. El conocimiento de la distribución de garrapatas puede ser una herramienta útil para predecir y asociarlo con los patógenos con algunas especies de garrapatas en particular<sup>62</sup>.

Las garrapatas y la fauna son los principales reservorios de TBRD y los cuales son de interés médico y veterinario. No obstante, ampliar el espectro de patógenos transmitidos por garrapatas que afectan a los animales domésticos y seres humanos, requiere de nuevos estudios sobre la epidemiología, diagnóstico y el entendimiento de la ecología. Por ejemplo, *R. massiliae*, una bacteria en primer lugar, aislada de *R. sanguineus* en Francia, se ha implicado en casos humanos de la fiebre manchada en Europa y América del sur. Al igual que otras enfermedades transmitidas por vectores (por ejemplo, la malaria, la leishmaniasis), TBRD pueden ser difíciles de controlar debido a su epidemiología compleja que puede implicar diferentes vectores y huéspedes animales<sup>58,60,60</sup>.

Estos datos proveen una base para futuros trabajos que ayudaran a clarificar como se da la interacción ecológica entre los vectores y patógenos Rickettsiales que pueden afectar la persistencia en zonas endémicas y por lo tanto el riesgo de adquisición de estas enfermedades en humanos y animales<sup>63</sup> y así, pudieran ayudar al diagnóstico, prevención y su control.



## IX. CONCLUSIONES

Existen preguntas fundamentales concernientes a los mecanismos moleculares y procesos específicos que incluyen la patogénesis, así como la dinámica de transmisión epidemiológica. Ciertamente, los mecanismos o el proceso de la emergencia de las enfermedades incluyen factores a nivel celular y molecular, pero también incluyen factores como el clima, la precipitación, los patrones de movimiento eólico, climas extremos, así como la ecología del patógeno, reservorios y vectores, pero también se tiene que incluir la relación de estos con el huésped; que incorporan factores relacionados al humano y los mecanismos sociales. Los cambios demográficos y sociales, además de los asociados a las alteraciones del medioambiente, y aún más, el esfuerzo para controlar a la enfermedad, han contribuido a la severidad del problema, como el uso desmedido de antibióticos, pesticidas, y uso de controles biológicos, que están afectando y a su vez ayudando a que el patógeno se adapte a su hospedero y medioambiente, facilitando una reemergencia de la enfermedad. El patógeno y sus hospederos (incluyendo al ser humano), se reproduce, crece y se adapta a su nuevo hábitat. Las TBRD, son un objetivo que está en constante movimiento por el cambio climático, así como por otras fuentes de la naturaleza o variaciones antropogénicas, y alguna enfermedad que sea sensible al medioambiente, reservorios o el vector se verá afectada.

En base a todo esto, la importancia de la iniciativa Una Salud, en el enfoque de las enfermedades transmitidas por las garrapatas, en el cual médicos, veterinarios, biólogos, ecologistas y demás disciplinas que pudieran estar ligadas, llaman a la unidad de sus esfuerzos para el manejo de estas enfermedades zoonóticas emergentes.

## X. LITERATURA CITADA

1. Chapman AS, Bakken JS, Folk SM, et al. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever, Ehrlichiosis and Anaplasmosis – United States. A practical guide for physicians and other health care and public health professionals. MMWR. Recommendations and Reports. 2006; 55:1-27.
2. Parola P. y Raoult D. Tick and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis*. 2001; 32:389 – 399.
3. CDC. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. 2008. Tomado de la página [http://www.cdc.gov/osels/ph\\_surveillance/nndss/casedef/elichiosis](http://www.cdc.gov/osels/ph_surveillance/nndss/casedef/elichiosis) el 05/04/2011.
4. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description de *Ehrlichia equi* and “HGE agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Intern. J. Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001; 51:2145-2165.
5. CDC. Anaplasmosis and Ehrlichiosis – Maine, 2008. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5837a2.htm> el día 05/04/2011. 11:44 am.
6. Newton PN. Sennetsu neorickettsiosis: a probable fish-borne cause of fever rediscovered in Laos. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2009; 81:190 – 194.
7. Rikihisa Y. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nature reviews: Microbiology*. 2010;8:328 – 339.
8. Gordillo PM., Vargas M, Solórzano F, et al. Demonstration de *Borrelia burgdorferi* sensu Stricto infection in ticks from the Northeast of Mexico. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:496–498.
9. Dantas TF. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latrielle, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy control. *Vet. Parasitol*. 2008;153:173 – 185.
10. Hoffmann A, López G. Biodiversidad de los ácaros en México. México. Fideicomiso Fondo de Cultura para la Biodiversidad. CONABIO. 2000.

11. Gardner SL, Holman RC, Krebs JW, et al. National surveillance for the human ehrlichiosis in the United States, 1997 – 2001. and proposed methods for evaluation of data quality. *Ann. New York Academic of Science*. 2003;990:80 -89.
12. Schmidt DG, Roberts LS. Foundations of Parasitology. 2<sup>nd</sup> Ed. C. V. Mosby. 1984:586-587.
13. Satta G, Chisu V, Cabras P, et al. Pathogens and symbionts in ticks: a survey on ticks species distributions and prencese of tick-transmitted microorganis in Sardinia, Italy. *J of Medical Microbioly*. 2010;10:1099-1114.
14. Notifiable diseases/deaths in selected cities weekly information. *Morb. Mortal. Wkly Rep* 2009; 57(52):1396-1407.
15. Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS. Ehrlichiosis in humans: Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis and Treatment. *Clin. Infect. Disea*. 2007;45. Suppl 1: S45–S51.
16. Boletín Epicemiología. Semana epidemiológica No 52 del 25 al 31 de diciembre de 2011 CENAPRECE 2012. [http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2011/sem52/pdf/cua 7.1.pdf](http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2011/sem52/pdf/cua%207.1.pdf)
17. Bowman D, Little SE, Lorentzen, J, et al. Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: Results of a national clinic-based serologic survey. *Vet Parasitology*. 2009;16 (12):138-148.
18. Thomas JR, Dumler JS, Clayton JA. Current management of human granulocytic Anaplasmosis, humans monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009; 7(6): 709-722. doi:10.1586/eri.09.44.
19. Góngora BR, Zavala VJ, Castro SC. et al. First case of human ehrlichiosis in Mexico. *Emerging Infectious Diseases*. 1999;5(3):481.
20. Bakken JS, Dumler JS. Anapalsmosis and ehrlichiosis. *Infect. Med*. 2004; 21:433-451.
21. Sosa GC, Gaxiola S, Cota SC, et al. Prevalencia de *Ehrlichia canis* y frecuencia de *Anaplasma phagocytophilum* en perros de Sinaloa. XVI Congreso Nacional de Patología Veterinaria. Sinaloa, México. (2008).

22. Sosa GC, Quintero MT, Gordillo MG. Prevalencia de Ehrlichiosis monocítica en humanos y perros de Sinaloa, México. *Enfermedades infecciosas y microbiología. Infectología y Microbiología Clínica, A. C.* 2009;28:S122
23. Martínez MM. Historia del tifo epidémico desde la época prehispánica hasta nuestros días. *Epidemiología. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información.* 2005.
24. Núñez OL. Estudio de la seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en México. 2000. [http://www.maicodemexico.com.mx/espanol/protocolo\\_canino.html](http://www.maicodemexico.com.mx/espanol/protocolo_canino.html)
25. Unver A, Pérez M, Orellana N, et al. Molecular and antigenetic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks and a human in Venezuela. *Clin Microbiology*, 2001;10 (2):2788-2793.
26. Tinoco L, Quiroz H, Quintero MT, et al. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* in Mexico-U.S border desert region: pilot study. *Animal and Veterinary Advances.* 2007; 6 (5):758-760.
27. Sosa G. C. Comparación de diagnósticos para *Ehrlichia canis* mediante ELISA y frotis sanguíneo correlacionándolos con la trombocitopenia en canidos naturalmente infectados en Sinaloa, México. Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa. 2007.
28. Sosa GC. Diferenciación genética de *Ehrlichia canis* en humanos, perros y garrapatas de Sinaloa, México. Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y la Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. 2011.
29. Sosa GC, Quintero MT, Gordillo P.M. Genetic differentiation of *E. canis* in humans between dogs and ticks from Sinaloa, México. TTP7. Zaragoza, España. 2011.
30. Bustamante MJ, Pon MA. Actualización en la vigilancia epidemiológica de "Rickettsiosis". Secretaría de Salud. 2010;6(27)6:16-19.
31. Guzmán CC, Robbins R, Pérez TM. The Ixodes (Acari: Ixodidae) of Mexico: parasite-host and host-parasite checklists. *Zootaxa.* 2007; 15553:47-58.

32. Paddock CD, Childs JE.. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003;16(1): 37-64.
33. Perez M, Bodor M, Zhang C, et al. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical sings in Venezuela. *Ann. NY Acad. Sci.* 2006;1078: 110-117.
34. Walker DH, Paddock CD, Dumler JS. Emerging and Re-emergins Tick-transmitted Rickettsial and Ehrlichial *Infections. Med. Clin. N. Am.* 2008;92:1345-1361.
35. Mercado UC. Rickettsiosis. Historia y actualidades. *Enf. Inf. Microbiologia.* 2010;30 (1): 25-31.
36. Dawson JE, Paddock CD, Warner CK. Tissue diagnosis of *Ehrlichia chaffeensis* in patients with fatal ehrlichiosis by use of immunohistochemistry, *in situ* hybridization and polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001;65:603-609.
37. Gorman RJ, Saxon S, Sned OC. Neurologic sequelae of Rocky Mountain spotted fever. *Peadiatr.* 1981;67:354-357.
38. Smith S, Sehdev PS, Jacobs R, et al. Human monocytic ehrlichiosis presenting as acute appendicitis during pregnancy. *Clin. Infect. Dis.* 2002;35: e99-e102.
39. Archibald LK y Sexton DJ. Long-term sequelae of Rocky Mountain spotted fever. *Clin. Infect. Dis.* 1995;20:1122-1125.
40. Tamí IC, Tamí-Maury IM. Identificación morfológica de *Ehrlichia* spp. en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana, en Venezuela. *Revista Panamericana Salud Pública.* 2004;16(5):345-349.
41. Bell CA, Patel R. A real-time combined polymerase chain reaction assay for the rapid detection and differentiation of *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii*. *Diagn. Mirobiol. Infect. Dis.* 2005;53(4): 301-306.
42. Warner CK, Dawson JE. Genus and species level identification of *Ehrlichia* species by PCR and Sequencing. En D. H. Persing (Eds.), *PCR protocols for emerging infectious diseases: a supplement to diagnostic molecular microbiology: principles and applications.* 1996; 100-105pp. California: Prensa Académica.

43. Coli P, Coque MT, Domínguez MA, et al. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. Editores. Emilia Cercenado y Rafael Cantón. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. SEIMC. 2005.
44. Yu XJ, McBride JW, Walker DH. Restriction and expansion of *Ehrlichia* strain diversity. *Veterinary parasitology*. 2006;143: 337-346.
45. Parola P, Davoust B, Raoult D. Tick and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet. Res*. 2005;36: 469-492.
46. Perez M, Rikihisa Y, Wen B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J. Clin. Microbiol*. 1996;34(9): 2133-2139.
47. Ratnasamy N, Everett ED, Roland WE, et al. Central nervous system manifestations of human ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis*. 1996;23:314-319.
48. Dong J, Olano JP, McBride JW, et al. Emerging Pathogens: Challenges and Successes of Molecular Diagnostics. *J of Molecular Diagnostics*. 2008;10(3): 185-197.
49. Protocolo para trampeo y procesamiento. Bajado el 31 de Enero de 2012 a las 12:45 hrs. De la página: [http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/hct\\_98104-protocolo.pdf](http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/hct_98104-protocolo.pdf).
50. Álvarez C, Bonilla MR. Adultos y ninfas de la garrapata *Amblyomma cajennense* Fabricius (Acari: Ixodidae) en equinos y bovinos. *Agronomía Costarricense*. 2007;31(001): 61-69.
51. Fernández SP. Garrapatas que parasitan a las personas en Castilla y León, determinación por serología de su parasitismo y detección molecular de los patógenos que albergan. Tesis doctoral de la Universidad de Salamanca de la Facultad de Biología. Castilla y León, España. 2003.
52. Williamson PC, Billingsley PM, Teltow GJ, Seals JP, Turnbough MA, Atkinson SF. Borrelia, Ehrlichia and Rickettsia spp. in ticks removed from persons, Texas, USA. *Emerging Infectious Diseases*. 2010; 16 (3): 441-446.

53. Olano JP, Wen G, Feng Hui-Min, McBride JW, Walker DH. Histologic, serologic and molecular analysis of persistent Ehrlichiosis in a Murine Model. *Am. J. of Pathology*. 2004; 165(3): 997-1005.
54. Dong J, Olano JP, McBride JW, Walker DH. Emerging pathogens: Challenges and successes of molecular diagnostics. *J. Mol. Diagnostics*. 2008; 10(3): 185-197.
55. Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Cell*. 2012; 28(10): 437-447.
56. Foley, J.E., Nieto, N.C., Adjemian, J., Dabritz, H. and Brown, R. *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Small Mammal Host of Ixodes Ticks, Western United States. 2008. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 14, 1147-1150.
57. Walls, J., Greig, B., Neitzel, D. and Dumler, S. Natural Infection of Small Mammal Species in Minnesota with the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis. 1997. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 853-855.
58. Sosa-Gutiérrez, C. , Vargas, M. , Torres, J. and Gordillo-Pérez, G. Tick-Borne Rickettsial Pathogens in Rodents from Mexico. 2014. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 7, 884-889. doi: 10.4236/jbise.2014.711087.
59. Chae, J.S., Yu, D.H., Shringi, S., Klein, T.A., Kim, H.C., Chong, S.T., Lee, I.Y. and Foley, J. Microbial Pathogens in Ticks, Rodents and a Shrew in Northern Gyeonggi-Do near the DMZ, Korea. 2008. *Journal of Veterinary Science*, 9, 285-293.
60. Kim, C.M., Yi, Y.H., Yu, D.H., Lee, M.J., Cho, M.R., Desai, A.R., Shringi, S., Klein, T.A., Kim, H.C., Song, J.W., Baek, L.J., Chong, S.T., O'Guinn, M.L., Lee, J.S., Lee, I.Y., Park, J.H., Foley, J. and Chae, J.S. Tick-Borne Rickettsial Pathogens in Ticks and Small Mammals in Korea. 2006 *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5766-5776.
61. Medina-Sanchez A, Bouyer DH, Alcantara-Rodriguez A, Mafra C, Zavala-Castro J, Whitworht T, Popov V, Fernandez-Salas I., Walker DH. Detection of a Typhus Group Rickettsia in Amblyomma Ticks in the State of Nuevo Leon, Mexico. 2005 . *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1063: 327–332. doi: 10.1196/annals.1355.052.

62. Feria-Arroyo, T.P., Castro-Arellano, I., Gordillo-Perez, G., Cavazos, L., Vargas-Sandoval, M., Grover, A., Torres, J., Medina, R.F., Pérez de León, A. and Esteve-Gassent, M.D. Implications of Climate Change on the Distribution of The tick Vector *Ixodes scapularis* and Risk for Lyme disease in the Texas-Mexico transboundary Region. 2014. *Parasites & Vectors*, 7, 199. doi:10.1186/1756-3305-7-199.

63. Gubler, D., Raiter, P., Ebi, K., Yap, W., Nasci, R. and Patz, J. Climate Variability and Change in the United States: Potential Impacts on Vector and Rodent-Borne Diseases. 2001. *Environmental Health Perspectives*, 102, 223-233.