



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Detección de *Anaplasma* y *Ehrlichia* sp. en
mamíferos pequeños del estado de Hidalgo,
México**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

(BIÓLOGO)

P R E S E N T A:

Kevin Alejandro Hernández Vilchis



DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser
Ciudad Universitaria, CD. Mx., 2019



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.

1. Datos del alumno.

Hernández

Vilchis

Kevin Alejandro

54 43 44 73

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

311282692

2. Datos del tutor

Dra.

Ingeborg Dorothea

Becker

Fausser

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Daniel Sokani

Sánchez

Montes

4. Datos del sinodal 2

MC.

Pablo Francisco

Colunga

Salas

5. Datos del sinodal 3

MC.

Isabel Cristina

Cañeda

Guzmán

6. Datos del sinodal 4

Biól.

Giovani

Hernández

Canchola

7. Datos de la tesis.

Hernández Vilchis K. A., 2018. Detección de *Anaplasma* y *Ehrlichia* sp. en mamíferos pequeños del estado de Hidalgo, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.

73 p.

8. Palabras clave (temas principales que trata la tesis):

Roedores, Prevalencia, Zoonosis

Agradecimientos

El presente trabajo fue desarrollado con gran esfuerzo y dedicación, en este contribuyeron muchas personas y finalmente esta culminado.

Muchas gracias a:

A la Biól. Ali Zeltzin Lira Olguin y al Dr. César Antonio Ríos Muñoz por su apoyo en la colecta de los mamíferos.

A la Dra. Livia Socorro León Paniagua, al Dr. Lázaro Guevara López y al Biol. Martín Yair Cabrera Garrido por su apoyo en la identificación de mamíferos.

Al Dr. Daniel Sokani Sánchez Montes por su apoyo y dirección en la estandarización de las actividades de biología molecular [extracción, PCR, electroforesis] y el análisis para la identificación molecular [edición y alineamiento de secuencias con el programa MEGA 7].

A la M en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar por su apoyo técnico en la secuenciación de los productos de PCR.

Al M en C. Pablo Francisco Colunga Salas por su apoyo en los análisis de sistemática molecular.

A la Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser, jefa del Centro de Medicina Tropical de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM por su apoyo en la elaboración de esta tesis.

Este trabajo fue financiado por los programas CONACyT 221405 y PAPIIT IN217515.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Generalidades de Garrapatas	3
3.2 Taxonomía de <i>Anaplasma</i> y <i>Ehrlichia</i>	4
3.3 Ciclo de vida	8
3.5 Importancia medica en humanos	10
3.5.1 Anaplasmosis Granulocítica Humana.....	11
3.5.2 Ehrlichiosis Monocítica Humana	12
3.5.3 Ehrlichiosis Granulocítica Humana	13
4. ANTECEDENTES DE <i>ANAPLASMA</i> y <i>EHRlichia</i> EN MÉXICO.....	14
4.1 <i>Anaplasma</i>	14
4.2 <i>Ehrlichia</i>	19
5. JUSTIFICACIÓN	25
6. OBJETIVOS	26
6.1 General.....	26
6.2 Particulares	26
7. MATERIAL Y MÉTODOS	27
7.1 Trabajo de campo	27
7.1.1 Área de estudio	27
7.1.2 Colecta de hospederos	28
7.1.3 Extracción y preservación de bazo e hígado	29
7.1.4 Identificación de mamíferos pequeños	29
7.2 Trabajo de laboratorio.....	29

7.2.1 Extracción de DNA.....	29
7.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa [PCR]	30
7.2.3 Electroforesis	31
7.2.4 Secuenciación	31
7.2.5 Reconstrucción filo genética.....	32
8. RESULTADOS	34
8.1 Colecta de Hospederos	34
8.2 Detección de <i>Anaplasma</i> y <i>Ehrlichia</i>	35
8.3 Reconstrucción filo genética.....	37
9. DISCUSIÓN	41
10. CONCLUSIONES	47
11. BIBLIOGRAFIA	48
12. ANEXO I Diagnóstico y tratamiento para Anaplasmosis y Ehrlichiosis humanas	61
Anaplasmosis Granulocítica Humana.....	61
Ehrlichiosis Monocítica Humana	63
Ehrlichiosis Granulocítica Humana	64
13. ANEXO II Biología de los hospederos recolectados	65
<i>Peromyscus beatae</i> (Thomas, 1903).....	65
<i>Reithrodontomys sumichrasti</i> (Saussure, 1861)	66
<i>Rattus norvegicus</i> (Berkenhout, 1796)	67
<i>Mus musculus</i> (Linnaeus, 1758)	68
<i>Sorex ventralis</i> (Merriam, 1895).....	69
<i>Myotis velifer</i> (J. A. Allen, 1890)	71

1. RESUMEN

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos que parasitan todos los grupos de vertebrados terrestres, son consideradas a nivel mundial como el segundo grupo de vectores transmisores de patógenos más importantes en población humana y el grupo de vectores más importantes en la transmisión de agentes patógenos en animales domésticos. Un par de géneros transmitidos por garrapatas son *Anaplasma* y *Ehrlichia* las cuales engloban un conjunto de proteobacterias, Gram negativas, parásitas intracelulares obligadas, las cuales presentan ciclos complejos que involucran la presencia de garrapatas [principalmente *Rhipicephalus sanguineus* y *Dermacentor variabilis*] y múltiples hospederos vertebrados [eg. cánidos y roedores]. A nivel mundial se reconocen cinco especies de *Ehrlichia* y seis especies de *Anaplasma* de importancia médica y veterinaria, las cuales provocan ehrlichiosis y anaplasmosis, zoonosis emergentes transmitidas por la mordedura de garrapatas y que frecuentemente presentan coinfección con otros agentes rickettsiales [eg. *Neorickettsia* y *Rickettsia*]. Por tal motivo el objetivo del trabajo fue determinar la prevalencia de *Anaplasma* y *Ehrlichia* en mamíferos pequeños del estado de Hidalgo en dos focos con presencia de rickettsiosis. Para ello se realizó un trabajo de campo durante agosto y septiembre del 2015 en dos localidades del estado de Hidalgo, en cada localidad muestreada se colocaron trampas Sherman durante cuatro noches. Se recolectó un total de 40 mamíferos los cuales se sacrificaron *in situ*, y a partir de los cuales se extrajeron fragmentos de bazo e hígado que fueron conservados en etanol absoluto hasta su procesamiento en el laboratorio. Para la detección de *Anaplasma* y *Ehrlichia* se realizó la técnica de PCR para la amplificación de un fragmento del gen 16S rRNA. De las 40 muestras analizadas, 11 resultaron positivas, lo cual representa una prevalencia del 27.5% para *Anaplasma* y *Ehrlichia* en mamíferos pequeños del estado de Hidalgo. Los mamíferos que resultaron positivos pertenecen a los géneros *Peromyscus*, *Mus*, *Sorex* y *Reithrodontomys*. Todos los registros representan los primeros estudios de *Anaplasma* y *Ehrlichia* asociadas con roedores del estado de Hidalgo.

2. ABSTRACT

Ticks are hematophagous ectoparasites that parasitize all groups of terrestrial vertebrates, are considered worldwide as the second most important group of vectors of pathogens in the human population and the most important group of vectors in the transmission of pathogens in domestic animals. Some of these bacterial genera are *Anaplasma* and *Ehrlichia* which encompass a set of proteobacteria, gram-negative, obligate intracellular parasites, which count whit cycles that involve the presence of ticks [mainly canids and rodents]. Worldwide, five species of *Ehrlichia* and six species of *Anaplasma* of medical and veterinary importance are recognized, which cause ehrlichiosis and anaplasmosis, emerging zoonoses transmitted by the tick bite that frequently present coinfection with other rickettsial agents [eg. *Neorickettsia* and *Rickettsia*]. For this reason, the objective of the study was to determine the prevalence of *Anaplasma* and *Ehrlichia* in small mammals of the state of Hidalgo in two foci with the presence of rickettsial diseases. For this, fieldwork was carried out during August and September 2015 in two locations in the state of Hidalgo. Sherman traps were placed in each sampled area for four nights. A total of 40 animals were recaptured that were sacrificed in situ and fragments of spleen and liver were extracted that were preserved in absolute ethanol until processing in the laboratory. For the detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia*, the PCR technique was used to amplify a fragment of the 16S rRNA gene. Of the 40 samples analyzed, 11 it was positive results, representing a prevalence of 27.5% for *Anaplasma* and *Ehrlichia* in small mammals of the state of Hidalgo. The mammals that were positive belong to the genera *Peromyscus*, *Mus*, *Sorex* and *Reithrodontomys*. All records represent the first studies of *Anaplasma* and *Ehrlichia* with rodents from the state of Hidalgo.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Generalidades de Garrapatas

Existen más de 200 enfermedades que son transmitidas directa o indirectamente entre humanos y animales, causadas por priones, virus, bacterias, hongos, protozoarios y helmintos, las cuales fueron definidas en 1958 como zoonosis, es decir, “enfermedades e infecciones, las cuales son naturalmente transmitidas entre vertebrados y humanos, a través de vectores o por contacto” (Bauerfeind *et al.*, 2016).

Las garrapatas son artrópodos hematófagos obligados que se consideran como los segundos vectores más comunes de patógenos zoonóticos. Particularmente dos familias de garrapatas son capaces de transmitir una amplia gama de patógenos: la familia Ixodidae [garrapatas duras] que actualmente comprende más de 700 especies en todo el mundo y la familia Argasidae [garrapatas blandas] que comprende aproximadamente 210 especies. En los últimos 20 años se han identificado una gran cantidad de nuevos microorganismos patógenos relacionados con garrapatas, esto originado por múltiples factores que van desde la curiosidad de los médicos que enfrentan síndromes clínicos inusuales hasta las nuevas herramientas utilizadas por microbiólogos y entomólogos (Kernif *et al.*, 2016).

Borreliosis, Ehrlichiosis, Anaplasmosis y Rickettsiosis son algunas de las enfermedades emergentes transmitidas por garrapatas que se han descrito en todo el mundo y han presentado un incremento en su morbilidad durante la última década. En algunos casos los microorganismos han sido identificados a partir de garrapatas antes de que se establezca su relación causal con una enfermedad, ejemplos de nuevos patógenos asociados con infecciones humanas incluyen a *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, *Borrelia miyamotoi* y

algunas especies de *Rickettsia*. En contraste con otras enfermedades emergentes transmitidas por garrapatas como la ehrlichiosis primero fueron identificados los casos y la correlación con las garrapatas se hizo después (Kernif *et al.*, 2016).

3.2 Taxonomía de *Anaplasma* y *Ehrlichia*

La clasificación actual propuesta por Dumler *et al.* (2001), basado en análisis moleculares a partir de los genes 16S rRNA y *groESL*, reconoce dentro del orden Rickettsiales 3 familias: Bartonellaceae [género *Bartonella*], Anaplasmataceae [géneros: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Wolbachia*] y Rickettsiaceae [géneros: *Rickettsia*, *Orientia*]. La familia Anaplasmataceae a su vez incluye a los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Wolbachia* y *Neorickettsia*. [Imagen 1]. Todos estos organismos se clasifican como bacterias intracelulares Gram negativas que se multiplican dentro de vacuolas ligadas a la membrana de varios tipos celulares del hospedero. Con excepción del género *Neorickettsia*, estos patógenos son transmitidos por garrapatas a hospederos mamíferos y a menudo causan severas enfermedades en humanos, ganado, animales de compañía y animales de vida silvestre. Al menos seis especies del género *Anaplasma*, cinco de *Ehrlichia*, y dos recientemente reconocidas del género *Neoehrlichia* han sido descritas como bacterias de importancia médico-veterinaria. Las bacterias de estas familias pertenecen al orden Rickettsiales y muchas fueron originalmente clasificadas en otros taxa (Gaff *et al.*, 2014).

Las especies de que más afectan al ser humano de la familia Anaplasmataceae son *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii* y *Ehrlichia canis* (Dumler *et al.*, 2001; Bauerfeind *et al.*, 2016).

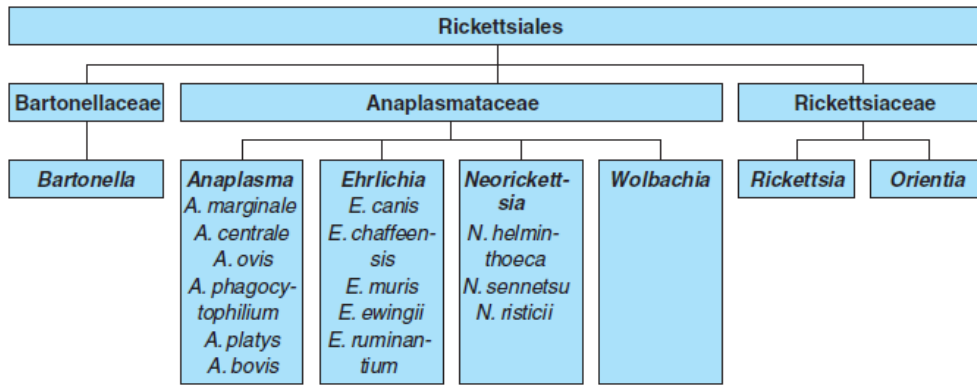


Imagen 1. Sistémática del orden Rickettsiales (Tomada de Bauerfeind *et al.*, 2016 y basada en los trabajos de Dumler *et al.*, 2001).

Anaplasma y *Ehrlichia*, pueden colonizar eritrocitos [*A. marginale* y *A. centrale*] leucocitos y tanto granulocitos [*A. phagocytophilum*] como monocitos [*Ehrlichia* sp.] La división de las bacterias se lleva a cabo por fisión dentro de inclusiones de membrana conocidas como colonias o mórulas en hospederos vertebrados y garrapatas [Imágenes 2, 3]. La lisis celular libera a las bacterias que a su vez pueden infectar a otras células (Gaff *et al.*, 2014; Bauerfeind *et al.*, 2016).

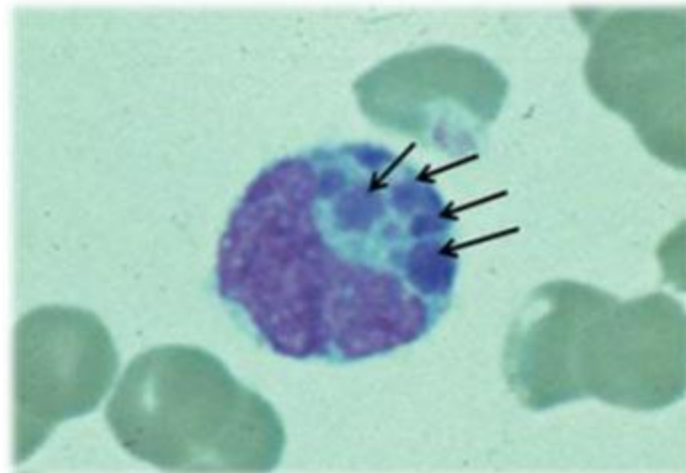


Imagen 2. Microfotografía de luz de leucocito de médula ósea de humano infectado con mórulas de *E. chaffeensis* (Tomada de Gaff *et al.*, 2014).

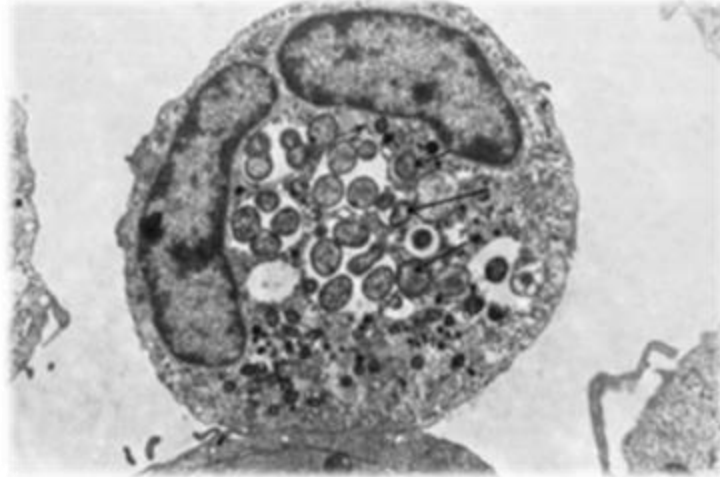


Imagen 3. Micrografía electrónica de granulocito de sangre periférica infectado con *Anaplasma phagocytophilum* de un paciente diagnosticado con anaplasmosis granulocítica humana (Tomada de Gaff *et al.*, 2014).

En los vertebrados, el ciclo de vida de *Anaplasma* y *Ehrlichia* incluye dos etapas: [i] una forma reticulada [0.4-0.6 μm por 0.7-1.9 μm] que es un estado vegetativo donde la bacteria se divide por fisión binaria y no puede sobrevivir extracelularmente; y [ii] una forma densa, generalmente cocoidal o elipsoidal [0.4-0.6 μm de diámetro] que sobrevive fuera de las células después de la liberación de la célula hospedera la cual es la forma infectiva. La forma infectiva entra a la célula hospedera vía endocitosis mediada por un receptor, una vez dentro estas bacterias se alojan en endosomas. Los endosomas con *A. phagocytophilum* y *E. chaffeensis* no se fusionan con lisosomas por lo cual no hay acidificación, de tal forma que están protegidos del estallido oxidativo, en el cuadro 1 se muestra la diversidad de especies de importancia medico veterinaria de *Anaplasma* y *Ehrlichia* (Gaff *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Especies de *Anaplasma* y *Ehrlichia* de importancia médica (Glaser *et al.*, 2010; Rar y Golovljova, 2011; Gaff *et al.*, 2014; Nagaraja & Walker 2015; Bauerfeind *et al.*, 2016)

Especies	Nombre de la enfermedad	Hospederos	Células infectadas	Vectores	Distribución
<i>A. bovis</i>	Anaplasmosis bovina	Ganado, Búfalos	Monocitos	<i>Amblyomma</i> sp., <i>Rhipicephalus</i> sp., <i>Hyalomma</i> sp.	África, Sur América, Asia
<i>A. centrale</i>	Anaplasmosis ligera en el ganado	Ganado	Eritrocitos	<i>Rhipicephalus simus</i>	En regiones tropicales y sub tropicales
<i>A. marginale</i>	Anaplasmosis bovina	Rumiantes, Ganado	Eritrocitos	<i>Dermacentor</i> sp., <i>Rhipicephalus</i> sp.	En regiones tropicales y sub tropicales
<i>A. ovis</i>	Anaplasmosis ovina	Ovejas, Cabras, Rumiantes	Eritrocitos	<i>Dermacentor</i> sp., <i>Rhipicephalus</i> sp.	Estados Unidos y Europa
<i>A. phagocytophilum</i>	Anaplasmosis granulocítica humana/canina /equina	Humanos, Venados, Roedores, Alces, Caballos, Llamas, Ovejas, Ganado, Bisontes	Granulocitos	<i>Ixodes scapularis</i> , <i>Ixodes pacificus</i> , <i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes persulcatus</i>	En todo el mundo
<i>A. platys</i>	Trombocitopenia cíclica canina	Perros	Plaquetas	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Estados unidos, México, Asia
<i>E. canis</i>	Ehrlichiosis canina	Humanos Perros, Lobos, Chacales	Monocitos, Macrófagos	<i>R. sanguineus</i> , <i>Dermacentor variabilis</i>	En todo el mundo
<i>E. chaffeensis</i>	Ehrlichiosis monocítica humana	Humanos, Perros, Venados	Monocitos, Macrófagos	<i>Amblyomma americanum</i>	Europa, África, América, Asia
<i>E. ewingii</i>	Ehrlichiosis granulocítica humana-canina	Humanos, Perros, Venados	Granulocitos	<i>Amblyomma americanum</i>	Estados Unidos, África, Asia
<i>E. muris</i>	Esplenomegalia murina	Roedores pequeños	Monocitos. Macrófagos	<i>Haemaphysalis</i> sp., <i>Ixodes</i> sp.	Europa, Asia, Estados Unidos
<i>E. ruminantium</i>	Cowdriosis/ Hidropericardio	Ganado, Ovejas, Cabras, Rumiantes	Células endoteliales Neutrófilos, Macrófagos	<i>Amblyomma</i> sp.	África, Caribe

3.3 Ciclo de vida

Los ciclos de vida de *Anaplasma* y *Ehrlichia* sp. incluyen a las garrapatas actuando como vectores y también como hospederos y a los vertebrados actuando como hospederos [Imagen 4]. *Anaplasma* y *Ehrlichia* sp. son capaces de causar una infección persistente en los hospederos vertebrados lo cual ocasiona que estos puedan considerarse como reservorios (Rar y Golovljova, 2011).

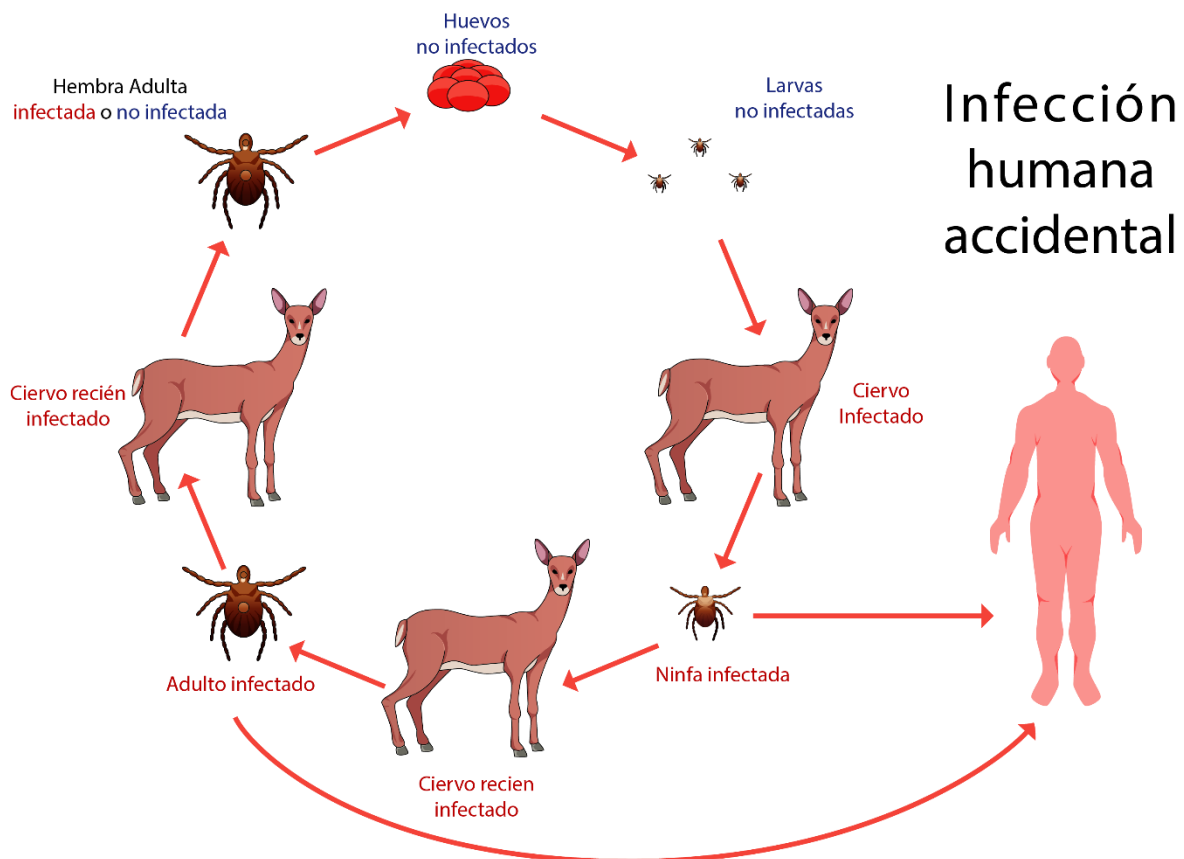


Imagen 4. Ciclo de vida de *Anaplasma* y *Ehrlichia*. El ciclo comienza cuando una garrapata en fase adulta la cual puede estar infectada o no, pone huevos que no están infectados debido a que no hay transmisión transovárica, posteriormente estos eclosionan y las larvas de igual forma no se encuentran infectadas. Al momento en el que la larva se alimenta de un hospedero infectado esta adquiere la bacteria, la larva sigue su crecimiento hasta convertirse en ninfa, esta puede pasar la bacteria al ser humano o seguir infectando otro tipo de vertebrados hasta llegar a su etapa adulta en la cual va a seguir infectando nuevos vertebrados (Tomada de Nagaraja y Walker, 2015).

La infección de las garrapatas se lleva a cabo al momento de alimentarse de su hospedero previamente infectado. Al interior de la garrapata, *Anaplasma* y *Ehrlichia* invaden las células del epitelio del intestino medio de la garrapata donde se da su replicación primaria y se forman largas colonias unidas a la membrana, conteniendo numerosos organismos. Después *Anaplasma* y *Ehrlichia* se mueven a las glándulas salivales de la garrapata para invadir las células [Imagen 5]. En las células de las glándulas salivales *Anaplasma* y *Ehrlichia* experimentan un segundo ciclo de reproducción y al encontrarse en la secreción de la glándula salival son transmitidos cuando la garrapata se alimenta de otro hospedero vertebrado (Rar y Golovljova, 2011).

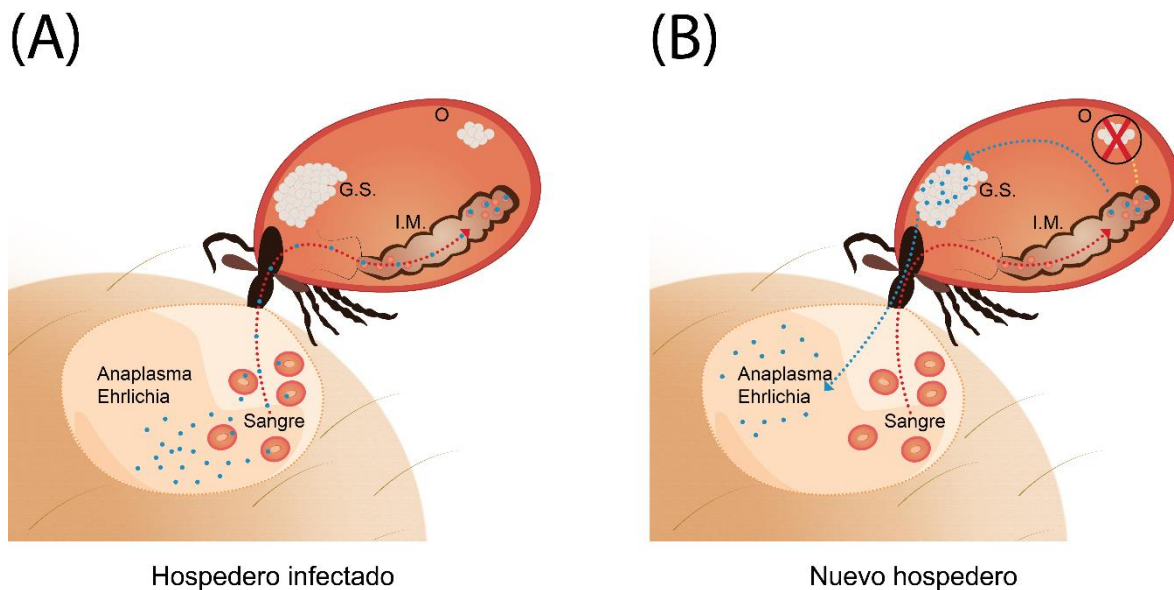


Imagen 5. Transmisión de *Anaplasma* y *Ehrlichia* en la garrapata. [A] Una garrapata alimentándose de un hospedero infectado por *Anaplasma* y *Ehrlichia* [puntos azules], la flecha roja indica el paso de la sangre hasta el intestino medio [I.M.]. [B] Garrapata infectada alimentándose de un hospedero sano, la flecha roja indica el paso de la sangre hasta el intestino medio [I. M.], la flecha azul indica el recorrido de *Anaplasma* y *Ehrlichia* previamente adquiridas [puntos azules] colonizando en intestino medio, posteriormente *Anaplasma* y *Ehrlichia* migran a las glándulas salivales [G.S.], *Anaplasma* y *Ehrlichia* son liberadas en la saliva mientras la garrapata se está alimentando. La flecha amarilla se encuentra cortada ya que no hay migración hacia los ovarios [O] (Tomada y modificada de Ondrej *et al.*, 2013).

Las garrapatas son capaces de transmitir *Anaplasma* y *Ehrlichia* de manera transestadial, esto es de larvas a ninfas y de ninfas a adultos pero no de forma transovárica, es decir, de una hembra infectada a los huevos [Imagen 6]. Por otro lado, también se pueden infectar al alimentarse de hospederos previamente infectados y en el siguiente estadio pueden transmitir el agente patógeno a un vertebrado sano (Rar y Golovljova, 2011).

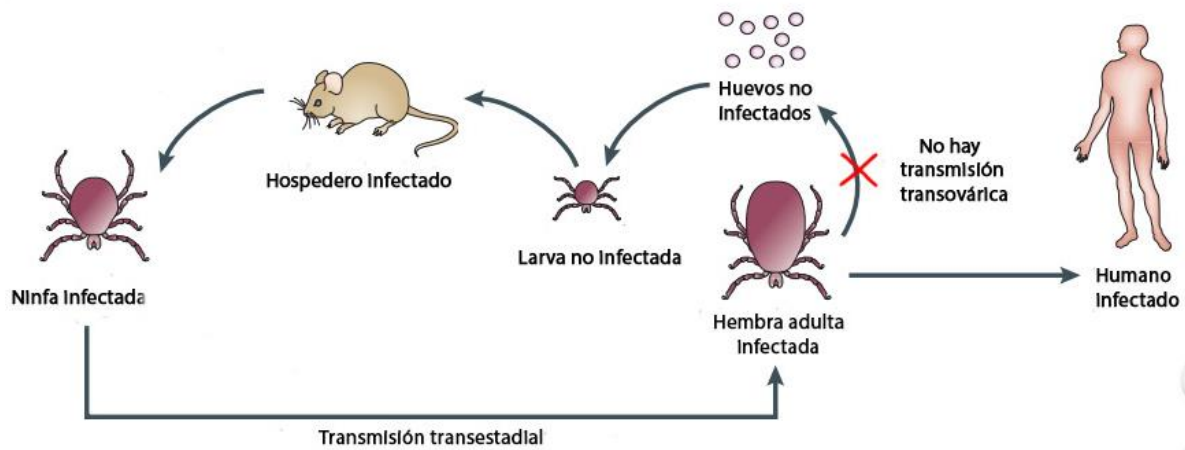


Imagen 6. Transmisión transestadial en la garrapata (Tomada y modificada de Walker e Ismail, 2008)

3.5 Importancia medica en humanos

La ehrlichiosis y la anaplasmosis son enfermedades causadas por varias especies de *Anaplasma* y *Ehrlichia*. Las especies que afectan al ser humano son *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii* y *E. canis*. Los cuadros producidos por estas bacterias son muy similares, en la mayoría de los casos se produce fiebre, dolor de cabeza, mialgia, artralgia, náusea, vómito, pancitopenia y daño en hígado (Bauerfeind *et al.*, 2016).

3.5.1 Anaplasmosis Granulocítica Humana

Enfermedad causada por *A. phagocytophilum*, cuando el hospedero es infectado las bacterias se propagan a través del sistema circulatorio, invadiendo nuevas células. En humanos la infección inicia con síntomas que ocurren típicamente de cinco a 21 días después de la exposición, se presenta un cuadro febril agudo parecido al provocado por la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas, pero sin erupciones. Otros signos y síntomas son fiebre alta, dolor de cabeza, mialgia, artralgia, náuseas y problemas gastrointestinales. Rara vez se presenta dolor abdominal, diarrea y tos. En muchos pacientes se presenta leucopenia y trombocitopenia (Gaff *et al.*, 2014).

En muchos casos la enfermedad se resuelve espontáneamente sin tratamiento. Sin embargo, en pacientes tratados con antibióticos inapropiados se ha informado que la fiebre persiste de una a cuatro semanas. La tasa de mortalidad es baja [menos del cinco por ciento] y aproximadamente el 60 % de las infecciones son asintomáticas. Las complicaciones frecuentes son el síndrome de dificultad respiratoria aguda, insuficiencia renal aguda, colapso hemodinámico, shock y las infecciones oportunistas graves (Glaser *et al.*, 2010; Gaff *et al.*, 2014; Bauerfeind *et al.*, 2016).

El diagnóstico se puede realizar a partir de un frotis sanguíneo, una punción lumbar, un serodiagnóstico o una reacción en cadena de la polimerasa [PCR, por sus siglas en inglés], actualmente la reacción en cadena de la polimerasa se considera la prueba más sensible para detectar *A. phagocytophilum*. La terapia actual recomendada es la administración de doxiciclina o tetraciclina por 5 a 14 días. El retraso del diagnóstico en pacientes mayores e inmunocomprometidos puede resultar en un riesgo mayor de enfermedad grave, incluida la muerte. Así que se recomienda la administración inmediata del antibiótico para cualquier

paciente confirmado o sospechoso [Anexo I] (Glaser *et al.*, 2010; Gaff *et al.*, 2014; Severo *et al.*, 2015).

3.5.2 Ehrlichiosis Monocítica Humana

Enfermedad causada por *E. chaffeensis*, fue descrita por primera vez en 1986 en Estados Unidos con más de 2300 casos reportados por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades [CDC por sus siglas en inglés]. Esta bacteria infecta células fagocíticas mononucleares, incluidos los macrófagos, con una preferencia por monocitos. Las células infectadas sufren lisis, liberando a la bacteria para infectar otros monocitos (Glaser *et al.*, 2010; Rar y Golovljova, 2011; Gaff *et al.*, 2014)

Después de la exposición a una garrapata infectada, una persona puede experimentar los siguientes síntomas: fiebre, malestar general, dolor de cabeza, náuseas y mialgia. Algunos pacientes también experimentan artralgia, vomito, erupciones, tos, diarrea, confusión y rigidez en el cuello. Esta enfermedad es más severa que la ehrlichiosis causada por *E. ewingii*, ya que varios casos requieren hospitalización y un tres por ciento de los mismos resultan fatales. Al tratarse de una enfermedad multisistémica diseminada, puede manifestarse como síndrome de dificultad respiratoria aguda, meningoencefalitis o shock tóxico. En casos severos, las complicaciones reportadas incluyen meningoencefalitis aséptica, insuficiencia renal aguda, insuficiencia cardiovascular, miocarditis, hemorragia y coagulopatía intravascular diseminada. La patología en hígado incluye infección de hepatocitos, muerte celular, necrosis focal del tejido, daño epitelial del conducto biliar y estenosis microvesicular (Glaser *et al.*, 2010; Gaff *et al.*, 2014).

La examinación de un frotis de sangre es una manera rápida de diagnosticar esta enfermedad, sin embargo, la técnica de PCR es altamente sensible para la detección de *E. chaffeensis* hasta en un 85%. El tratamiento recomendado es con doxiciclina, la respuesta al tratamiento generalmente es rápida y los pacientes generalmente se vuelven afebriles en menos de tres días [Anexo I] (Glaser *et al.*, 2010; Gaff *et al.*, 2014).

3.5.3 Ehrlichiosis Granulocítica Humana

Típicamente es una enfermedad encontrada en los perros, pero los casos humanos fueron reportados en 1999 por primera vez, esta enfermedad es causada por *E. ewingii*. Esta bacteria infecta granulocitos, generalmente causa una forma más leve que la enfermedad causada en perros y humanos por *E. canis* y *E. chaffeensis* respectivamente, los síntomas son parecidos a los producidos por la anaplasmosis granulocítica humana y la ehrlichiosis monocítica humana, aunque con manifestaciones más leves (Glaser *et al.*, 2010; Gaff *et al.*, 2014).

El diagnóstico de ehrlichiosis granulocítica humana se lleva a cabo mediante PCR específica para *E. ewingii*, no hay ensayos que evalúen el tratamiento de *E. ewingii*, sin embargo, la doxiciclina se considera como tratamiento para adultos y niños (Glaser *et al.*, 2010).

4. ANTECEDENTES DE ANAPLASMA y EHRLICHIA EN MÉXICO

4.1 Anaplasma

En 1910 se identificó a la bacteria *A. marginale* como el agente etiológico de una enfermedad caracterizada por fiebre, anemia, letargia, anorexia y una tasa significativa de letalidad. Subsecuentemente, este organismo fue reconocido como el agente etológico de la anaplasmosis bovina, una enfermedad que afecta al ganado en la mayor parte del mundo. Una segunda especie menos patogénica, *A. centrale*, fue reconocida y descrita en 1911 y ha sido usada como vacuna para *A. marginale*. Una tercera especie *A. ovis*, parasita eritrocitos de oveja (Gaff *et al.*, 2014).

Durante la mayor parte del siglo XX, las enfermedades causadas por *Anaplasma*. Y el género cercanamente relacionado *Ehrlichia* se creía que afectaban únicamente animales domésticos. *A. phagocytophilum* en un principio fue descrita como un patógeno de importancia veterinaria y fue originalmente descrita como *E. phagocytophila* infectando neutrófilos de ovejas y causando fiebre y *E. equi*, conocida por infectar caballos y causar la enfermedad conocida como Ehrlichiosis granulocítica equina (Gaff *et al.*, 2014).

La presencia de la Anaplasmosis en México se conoce desde los inicios del siglo XX. La incidencia alta de la enfermedad se encuentra en áreas con altitudes por debajo de los 1000 msnm, teniendo estrecha relación con la presencia de vectores en esas regiones. Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en el país y es una de las enfermedades económicamente más importantes para México ya que principalmente afecta a distintos tipos de ganado y la enfermedad puede causar un síndrome hiperagudo con muerte inmediata y un síndrome agudo o crónico, donde el proceso de engorde de animales en pastoreo se ve

seriamente afectado o incluso se pueden presentar abortos, lo cual se traduce en importantes pérdidas económicas (Osorno *et al.*, 1973; Cossío *et al.*, 1997).

Los primeros registros que se tienen en México son los pertenecientes al patógeno *A. marginale*, una bacteria que afecta principalmente al ganado bovino. Se tenía conocimiento de la enfermedad, sin embargo, los primeros estudios se empezaron a realizar hasta 1973 y se identificó que, *A. marginale* se encontraba distribuido principalmente en los estados que colindan con el golfo de México. Esta bacteria es la más estudiada en el país, debido a que es de gran importancia económica al afectar a distintos tipos de ganado, aunque también se ha registrado en perros, caballos y búfalos. De igual manera, se encuentran registros en múltiples vectores como *Stomoxys* [mosca de establo], *Chrysops* [mosca del venado], *Haematobia* [mosca de los cuernos] y algunos tábanos. En cuanto a su distribución geográfica, esta bacteria solo se ha registrado en 10 de los 32 estados de México [Chiapas, Coahuila, Guerrero, Hidalgo, Nayarit, Nuevo León, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán], siendo Nuevo León el estado con más casos registrados [Cuadro 2].

Para el caso de *A. phagocytophilum* el primer registro se encuentra en un estudio donde se analizaron 391 muestras de sangre provenientes de perros en Nuevo León. Esta bacteria se ha registrado en 19 de los 32 estados de México [Baja California, Chiapas, Ciudad de México, Durango, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz]. Además del perro, también se ha detectado en *Canis lupus baileyi*, algunos roedores de los géneros *Peromyscus*, *Microtus*, *Neotomodon*, *Reithrodontomys*, *Mus* y en algunos vectores como *R. sanguineus* y otras garrapatas no identificadas [Cuadro 2].

En cuanto a la bacteria *A. platys* sólo existe un registro en la comarca lagunera [Chihuahua, Coahuila, Durango] en muestra de sangre de perros [Cuadro 2].

Por último existen dos trabajos en los cuales se trabajó con muestras de sangre de perros y muestras de garrapatas, en estos trabajos se encontró evidencia de la presencia de DNA de un miembro del género *Anaplasma*, pero no se determinó la especie. De manera general, el género *Anaplasma* se ha detectado en 29 de los 32 estados de México, careciendo de registros los estados de Campeche, Tlaxcala, y Zacatecas. Adicionalmente no existen casos clínicos reportados en humanos [Cuadro 2].

Cuadro 2. Listado de especies de *Anaplasma* registradas en México.

Especie de patógeno	Vector/Hospedero	Localidad	Municipio/estado	Año	Referencia
<i>A. marginale</i>	Ganado vacuno	ND	Sierra Ventana, Tamaulipas	2007	Almazán <i>et al.</i> , 2008
<i>A. marginale</i>	Ganado vacuno	ND	Soto la Marina, Tamaulipas	2007	Almazán <i>et al.</i> , 2008
<i>A. marginale</i>	Ganado vacuno	ND	Guayabas, Tamaulipas	2007	Almazán <i>et al.</i> , 2008
<i>A. marginale</i>	Ganado vacuno	ND	Palo Blanco, Tamaulipas	2007	Almazán <i>et al.</i> , 2008
<i>A. marginale</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i>	ND	Luz del Mar, Tamaulipas	2007	Almazán <i>et al.</i> , 2008
<i>A. marginale</i>	Ganado vacuno	20° 26'' N 97° 24'' W	Norte de Veracruz	ND	Osorno <i>et al.</i> , 1973
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	ND	Guerrero Centro	ND	Fragoso & Milián 1984
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	ND	Santiago Ixcuintla, Nayarit	ND	Fernández <i>et al.</i> , 1995
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	ND	Mérida, Yucatán	ND	Figueroa <i>et al.</i> , 1993
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	20° 26'' N 97° 24'' W	Norte de Veracruz	1994	García & Núñez, 1996
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	ND	Ticul, Yucatán	ND	Jiménez <i>et al.</i> , 2012
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	ND	Playa Vicente, Veracruz	ND	Jiménez <i>et al.</i> , 2012
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	ND	Tlapacoyan, Veracruz	ND	Jiménez <i>et al.</i> , 2012
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	ND	Soto la Marina, Tamaulipas	ND	Jiménez <i>et al.</i> , 2012
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	ND	Atitalaquia, Hidalgo	ND	Jiménez <i>et al.</i> , 2012

<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	ND	Tepic, Nayarit	ND	Jiménez <i>et al.</i> , 2012
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	ND	Palenque, Chiapas	ND	Jiménez <i>et al.</i> , 2012
<i>A. marginale</i>	<i>Bubalus bubalis</i>	ND	Sayula, Veracruz	ND	Lira <i>et al.</i> , 2017
<i>A. marginale</i>	<i>Bubalus bubalis</i>	ND	Villahermosa, Tabasco	ND	Lira <i>et al.</i> , 2017
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	ND	Playa Vicente, Veracruz	ND	López <i>et al.</i> , 1983
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	ND	Aldama, Tamaulipas	ND	López <i>et al.</i> , 1984
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	ND	Villa Comaltitlán, Chiapas	ND	López <i>et al.</i> , 1985
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	29° 13' N 101° 14' W	Las Margaritas, Coahuila	1994	Martínez <i>et al.</i> , 1999
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	24° 13' N 100° 14' W	La Grulla, Nuevo León	1994	Martínez <i>et al.</i> , 1999
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	27° 44' N 100° 05' W	San Emeterio, Coahuila	1994	Martínez <i>et al.</i> , 1999
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	27° 15' N 99° 50' W	La Azufrosa, Nuevo León	1994	Martínez <i>et al.</i> , 1999
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	27° 35' N 99° 51' W	Santo Niño, Tamaulipas	1994	Martínez <i>et al.</i> , 1999
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	27° 44' N 100° 04' W	Palo Blanco, Tamaulipas	1994	Martínez <i>et al.</i> , 1999
<i>A. marginale</i>	Ganado bovino	ND	Mérida, Yucatán	1984 1999	Rodríguez <i>et al.</i> , 2000
<i>A. phagocytophilum</i>	Perro	25° 40' 17" N 100° 18' 31" W	Monterrey, Nuevo León	ND	Salinas <i>et al.</i> , 2014
<i>A. phagocytophilum</i>	Perro	ND	San Bartolo Coyotepec, Oaxaca	ND	Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>A. phagocytophilum</i>	Perro	ND	San Agustín Etlá, Oaxaca	ND	Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>A. phagocytophilum</i>	<i>Peromyscus maniculatus</i> , <i>Peromyscus hylocetes</i> , <i>Peromyscus leucopus</i> , <i>Microtus mexicanus</i> , <i>Neotomodon alstoni</i> , <i>Reithrodontomys fulvescens</i> , <i>Mus musculus</i>	ND	Nuevo León, Tamaulipas, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Veracruz, Ciudad de México, Morelos, Guerrero, Oaxaca	2006 2012	Sosa <i>et al.</i> , 2014

<i>A. phagocytophilum</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	ND	Monterrey, Nuevo León	ND	Tamez <i>et al.</i> , 2015
<i>A. phagocytophilum</i>	Lobo (<i>Canis lupus baileyi</i>)	23° 24' – 23° 32' N 104° 08' – 104° 19' W	Reserva de la Biosfera, La Michilía, Durango	2013	Morales <i>et al.</i> , 2016
<i>A. phagocytophilum</i>	Garrapata no identificada	ND	Baja California, Sonora, Sinaloa, Durango, Tamaulipas, Nuevo León, San Luis Potosí, Jalisco, Morelos, Puebla, Veracruz, Guerrero, Oaxaca, Tabasco, Chiapas	1997 2013	Sosa <i>et al.</i> , 2016
<i>A. platys</i>	Perro	25°15' – 25°40' N 102°55' – 103°50' W	La Comarca Lagunera, Chihuahua, Coahuila y Durango	2011	Almazán <i>et al.</i> , 2016
<i>Anaplasma spp.</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	25°15' – 25°40' N 102°55' – 103°50' W	La Comarca Lagunera, Chihuahua, Coahuila y Durango	2011	Almazán <i>et al.</i> , 2016
<i>Anaplasma spp.</i>	Perro	ND	Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Sinaloa, Sonora Coahuila, Nuevo León, Colima, Jalisco, Nayarit, Puebla, Veracruz, Hidalgo, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Morelos, Quintana Roo, Yucatán, Chiapas, Guerrero	2011 2012	Movilla <i>et al.</i> , 2016

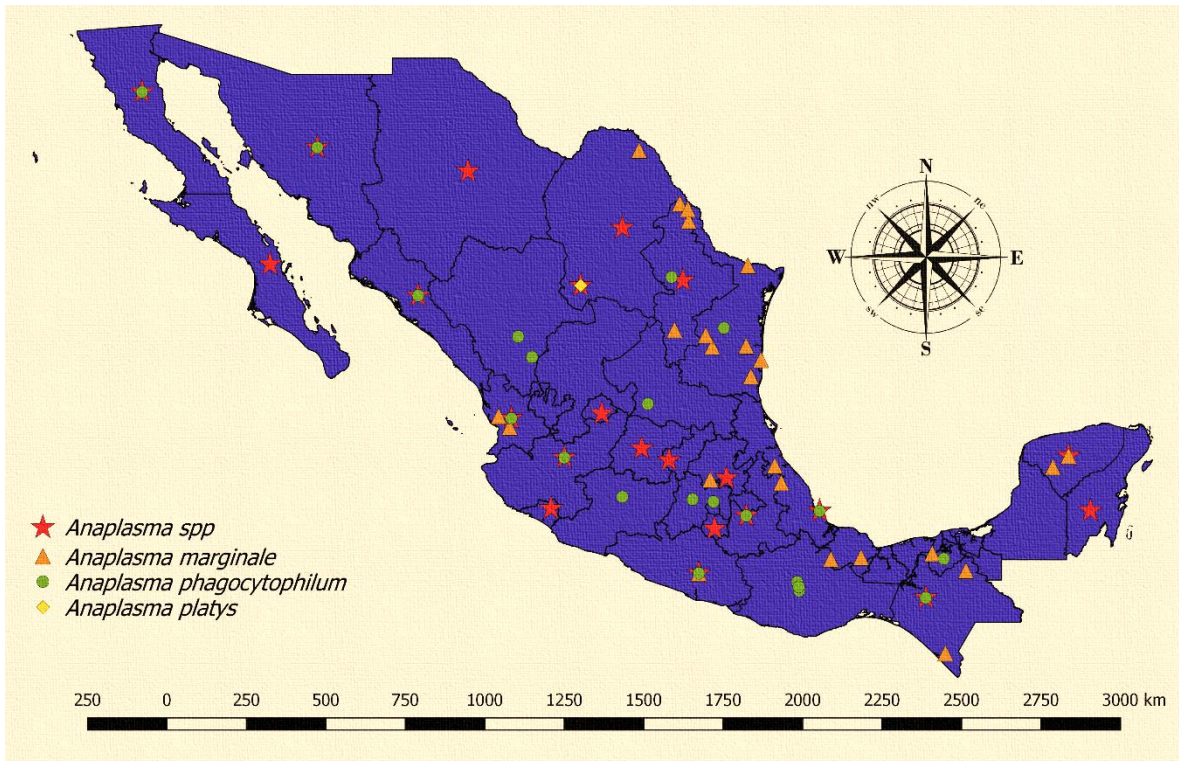


Imagen 7. Distribución geográfica de especies de *Anaplasma* registradas en México.

4.2 Ehrlichia

En 1987 se descubrió una especie de *Ehrlichia* que infecta monocitos de humanos en el sur de Estados Unidos, se identificó como *E. chaffeensis*, en conjunto se descubrió otro organismo único similar a *Ehrlichia* en neutrófilos de sangre de humanos en la parte superior del medio oeste de los Estados Unidos ahora conocido como *A. phagocytophilum* (Gaff *et al.*, 2014).

En México el primer caso registrado de *Ehrlichia* probablemente fue el del trabajo de García, 1996, en el cual se describe el caso de un perro de siete meses de edad presentado en el hospital para pequeñas especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, este perro presentaba depresión, hiporexia, y una infestación masiva con garrapatas,

además el examen físico arroja mucosas pálidas, linfadenomegalia generalizada, esplenomegalia y claudicación. El hemograma realizado mostro variaciones semejantes a casos típicos agudos de ehrlichiosis, sin embargo, no se realizó ningún estudio serológico o de ADN para confirmar el diagnóstico [Cuadro 3].

El primer caso registrado en humanos fue en febrero de 1997 una mujer de 41 años de edad proveniente de Mérida, Yucatán estuvo expuesta a garrapatas durante una actividad rural una semana antes de que comenzaran los síntomas de la enfermedad. Presentaba manifestaciones clínicas como hipertermia, erupciones, mialgia, dolor de cabeza, anorexia, fatiga y tos. La examinación física arrojó linfadenopatía cervical bilateral, una radiografía de tórax mostro un infiltrado bilateral intersticial y la citometría hemática mostro trombocitopenia. Una muestra de suero dio una reacción positiva mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta contra *E. chaffeensis*, no se detectaron monocitos ni granulocitos infectados. Sin embargo, al no ser realizadas pruebas moleculares no se puede descartar la probabilidad de que la enfermedad haya sido causada por *A. phagocytophilum* [Cuadro 3].

E. canis es la especie dentro de este género con más registros en México, esta bacteria se ha reportado en 29 de los 32 estados de México, los estados en donde no se han llevado a cabo estudios son Campeche, Tlaxcala y Zacatecas. Esta especie se ha detectado principalmente en perros, aunque también hay registros en algunos roedores como *Peromyscus*, *Microtus*, *Neotomodon*, *Reithrodontomys*, *Megadontomys*, *Orizomys*, *Neotoma*, así como en los vectores *D. variabilis*, *R. sanguineus* y además cuenta con un caso clínico reportado en el estado de Oaxaca [Cuadro 3].

En el caso de *E. chaffeensis* sólo hay 4 trabajos en los cuales se ha detectado esta bacteria y de los 32 estados de México únicamente se ha sido reportada en 12 [Ciudad de

México, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán]. Se ha detectado en roedores de los géneros *Peromyscus*, *Reithrodontomys*, *Megadontomys*, *Lyomis*, en algunas garrapatas no identificadas, además hay dos casos clínicos asociados a esta bacteria, uno en Yucatán y otro en el Estado de México. Adicionalmente existen dos trabajos en los estados de Nuevo León y Quintana Roo en los cuales se detectó el género, pero no se llegó a definir la especie estos trabajos fueron realizados [Cuadro 3].

Cuadro 3. Listado de especies de *Ehrlichia* registradas en México.

Especie de patógeno	Vector/ Hospedero	Localidad	Municipio/ estado	Año	Referencia
<i>E. canis</i>	Perro	25° 15'–25° 40' N 102° 55'– 103° 50' W	La Comarca Lagunera, Chihuahua, Coahuila y Durango	2011	Almazán <i>et al.</i> , 2016
<i>E. canis</i>	Perro	20° 49' 01" N 89° 37' 49" W	Molas, Yucatán	2009 2010	Díaz <i>et al.</i> , 2016
<i>E. canis</i>	Perro	32° 40' N 115° 28' W	Mexicali, Baja California	2005 2006	Haro <i>et al.</i> , 2007
<i>E. canis</i>	Perro	19° 30'–21° 35' N 87° 30'–90° 24' W	Mérida, Yucatán	2009	Jiménez <i>et al.</i> , 2009
<i>E. canis</i>	Perro	ND	Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Sinaloa, Sonora Coahuila, Nuevo León, Colima, Jalisco, Nayarit, Puebla, Veracruz, Hidalgo, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Morelos, Quintana Roo, Yucatán, Chiapas, Guerrero	2011 2012	Movilla <i>et al.</i> , 2016

<i>E. canis</i>	Perro	ND	Baja California Norte, Sonora, Tamaulipas, Baja California Sur, Sinaloa, Chihuahua, Yucatán, Chiapas, Veracruz, Nuevo León, Durango, Quintana Roo, Colima, Morelos, Jalisco, Oaxaca, Coahuila, Tabasco, Guanajuato, Estado de México, Querétaro, Ciudad de México, Puebla, Guerrero	ND	Núñez, 2003
<i>E. canis</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> Perro	ND	Mérida, Yucatán	2015	Pat <i>et al.</i> , 2015
<i>E. canis</i>	Perro	19° 30′-21° 35′ N 87° 30′-90° 24′ W	Mérida, Yucatán	2001	Rodríguez <i>et al.</i> , 2005
<i>E. canis</i>	Perro	25°40′17″ N 100° 18′31″ W	Monterrey, Nuevo León	2014	Salinas <i>et al.</i> , 2015
<i>E. canis</i>	Perro	ND	San Bartolo Coyotepec y San Agustín Etna, Oaxaca	ND	Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>E. canis</i>	Humano	ND	Oaxaca, Oaxaca	ND	Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>E. canis</i>	Perro	27° 02′-22° 29′ N 105°23′-109°28′ W	Culiacán, Sinaloa	2006 2007	Sosa <i>et al.</i> , 2013

<i>E. canis</i>	<i>Peromyscus maniculatus</i> , <i>Peromyscus hylocetes</i> , <i>Peromyscus megalops</i> , <i>Peromyscus beatae</i> , <i>Microtus mexicanus</i> , <i>Neotomodon alstoni</i> , <i>Reithrodontomys fulvescens</i> , <i>Megadontomys thomassi</i> , <i>Orizomys melanotis</i> , <i>Neotoma mexicana</i>	ND	Nuevo León, Tamaulipas, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Veracruz, Ciudad de México, Morelos, Guerrero, Oaxaca	2006 2012	Sosa <i>et al.</i> , 2014
<i>E. canis</i>	Perro, <i>H. leporispalustris</i> , <i>Dermacentor variabilis</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	ND	Sinaloa	2010 2011	Sosa <i>et al.</i> , 2016
<i>E. canis</i>	Garrapata	ND	Sinaloa, Jalisco, Tamaulipas, Nuevo León, Veracruz, San Luis Potosí, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tabasco	1997 2013	Sosa <i>et al.</i> , 2016
<i>E. canis</i>	Perro	32° 40' N 115° 28' W	Mexicali, Baja California	2003	Tinoco <i>et al.</i> , 2007
<i>E. chaffeensis</i>	Humano	ND	Mérida, Yucatán	1997	Gongóra <i>et al.</i> , 1999

<i>E. chaffeensis</i>	<i>Peromyscus maniculatus</i> , <i>Peromyscus beatae</i> , <i>Peromyscus leucopus</i> , <i>Reithrodontomys fulvescens</i> , <i>Megadontomys thomasi</i> , <i>Lyomis iroratus</i>	ND	Nuevo León, Tamaulipas, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Veracruz, Ciudad de México, Morelos, Guerrero, Oaxaca	2006 2012	Sosa <i>et al.</i> , 2014
<i>E. chaffeensis</i>	Humano	ND	Estado de México	2013	Sosa <i>et al.</i> , 2016
<i>E. chaffeensis</i>	Garrapata	ND	Tamaulipas, Veracruz, Estado de México, Ciudad de México, Morelos	1997 2013	Sosa <i>et al.</i> , 2016
<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>R. sanguineus</i>	ND	Monterrey, Nuevo León	ND	Tamez <i>et al.</i> , 2015
<i>Ehrlichia</i> spp.	Perro	18° 30' 00'' N 87° 44' 49'' W	Xcalak, Quintana Roo	ND	Martínez <i>et al.</i> , 2016

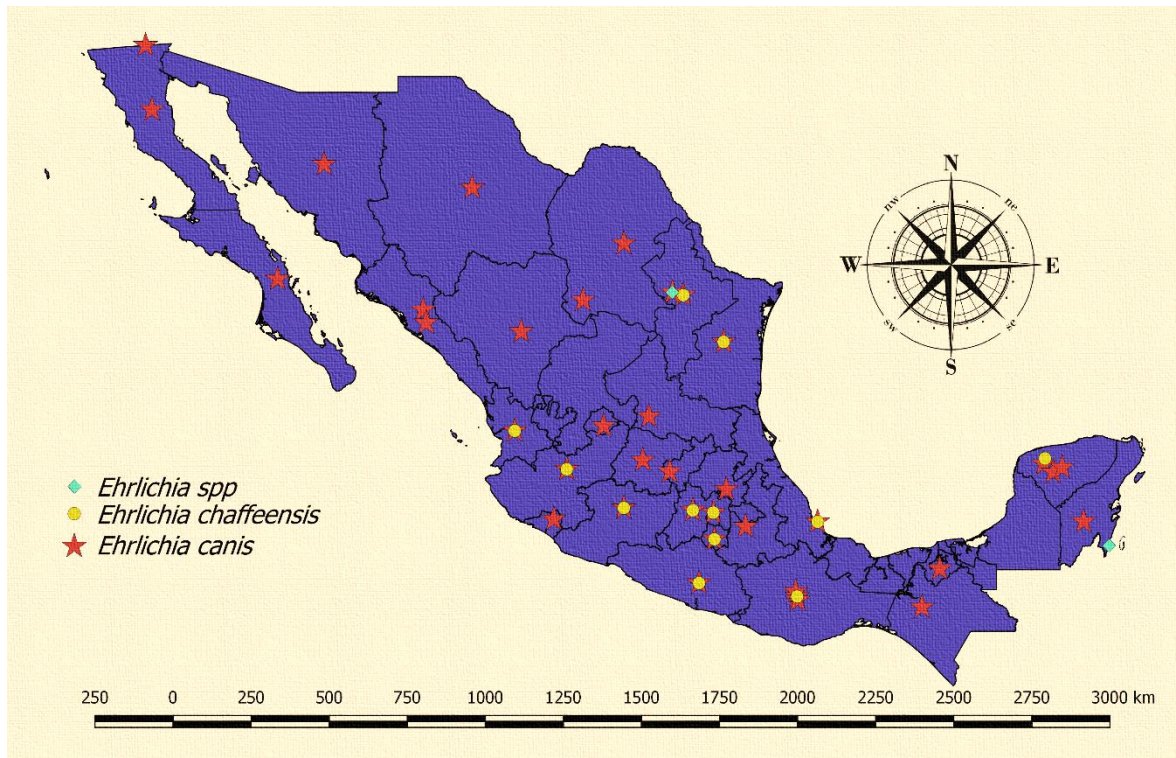


Imagen 8. Distribución geográfica de especies de *Ehrlichia* registradas en México.

5. JUSTIFICACIÓN

Debido a la diversidad de mamíferos, garrapatas y a la presencia de *Rickettsia* en Hidalgo, es probable que en la zona seleccionada para llevar a cabo el muestreo se vaya a encontrar la presencia de *Anaplasma* y *Ehrlichia*.

6. OBJETIVOS

6.1 General

Detectar la presencia de *Anaplasma* y *Ehrlichia* en mamíferos pequeños del estado de Hidalgo mediante métodos moleculares, para generar una reconstrucción filogenética.

6.2 Particulares

- ❖ Emplear el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa [PCR] para la detección de *Anaplasma* y *Ehrlichia* en las muestras de bazo e hígado.
- ❖ Determinar la prevalencia en las especies de mamíferos recolectados.
- ❖ Determinar la identificación taxonómica de las bacterias.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Trabajo de campo

7.1.1 Área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo durante los meses de agosto y septiembre del 2015 en temporada de lluvias en dos localidades al suroeste de Hidalgo. La primer localidad, Rancho Santa Elena, situado al sur del Municipio de Huasca de Ocampo [20° 08' N, 98° 30' O] en una región montañosa llamada la Sierra de las Navajas. Se encuentra en una altitud entre los 2060 y los 2300 msnm, el tipo de vegetación dominante en la zona es bosque de pino-encino (INEGI, 1997); alberga una gran cantidad de flora y fauna y cerca se encuentran 3 cuerpos de agua: la presa de San Carlos, Las vigas y Agua Azul, además este Rancho es una propiedad privada bajo la Norma Mexicana de Ecoturismo Sustentable ya que lleva a cabo conservación del bosque y de la biodiversidad mediante UMA extensiva de Forestales no maderables [Laurel y Hongo blanco] y Fauna silvestre [Venado y Guajolote], también realiza actividades de ecoturismo al aire libre sin perturbar el ecosistema [campismo, senderismo, tiro con arco, pesca, caminatas, ciclismo de montaña, nado, remo en kayak, tirolesa, escalada y rappel].

La segunda localidad, Rancho Cruxtitla, se localiza en el Municipio de Mineral del Monte [20° 08' N, 98° 38' O]. Colinda al norte con los municipios de Mineral del Chico y Omitlán de Juárez, al este con Omitlán de Juárez y Epazoyucan, al sur con Epazoyucan y

Mineral de la Reforma. Se encuentra a una altitud que va de los 2200 a los 3100 msnm. El principal tipo de vegetación es bosque de pino y vegetación secundaria (INEGI, 1995).



Imagen 9. Localidades muestreadas en Hidalgo, Rancho Cruxtitla [punto amarillo] y Rancho Santa Elena [punto azul].

7.1.2 Colecta de hospederos

Los hospederos fueron colectados mediante trampas Sherman cebadas con avena y vainilla. Se colocaron tres transectos de 40 trampas cada uno, los cuales fueron revisados al día siguiente.

7.1.3 Extracción y preservación de bazo e hígado

Los mamíferos recolectados fueron sacrificados acorde con los lineamientos de la Sociedad Americana de Mastozoólogos para el uso de mamíferos silvestres en la investigación (Gannon & Sikes 2007). Posteriormente se realizó la necropsia de cada animal, extrayendo el hígado y el bazo, se hizo énfasis en estos órganos debido a que son filtradores de sangre, además en el bazo hay almacén de eritrocitos, plaquetas y glóbulos blancos los cuales son células que infectan *Anaplasma* y *Ehrlichia*. Estos órganos se colocaron en frascos con etanol al 96%, anexando los datos de colecta [fecha y localidad]. Finalmente, las muestras se guardaron a -20°C hasta la extracción de DNA (Motta *et al.*, 2016).

7.1.4 Identificación de mamíferos pequeños

Los ejemplares recolectados fueron depositados en la Colección de Mamíferos del Museo de Zoología Alfonso L. Herrera de la Facultad de Ciencias perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México dentro del catálogo LRR. La identificación se llevó a cabo con la ayuda de literatura especializada (Ceballos, G. 2014).

7.2 Trabajo de laboratorio

7.2.1 Extracción de DNA

La extracción del DNA de hígado y de bazo se llevó a cabo mediante el uso del Kit comercial “DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN”, se siguió el protocolo de extracción de

DNA de tejidos mediante columna. Primero, cada órgano se colocó en papel absorbente para quitar el exceso del alcohol. Posteriormente, se tomaron 25 mg de tejido y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, y se realizaron cortes más pequeños. Para lisar las muestras, se agregó 180 µl de Buffer ATL y 20 µl de proteinasa K, mezclando completamente con ayuda de un vórtex y se incubó a 56°C durante 24 horas. Una vez que transcurrieron las 24 horas se homogenizó la solución con ayuda del vórtex durante 15 segundos. Se agregaron 200 µl de Buffer AL y se mezcló de nuevo con ayuda del vórtex. Posteriormente se agregaron 200 µl de etanol al 96% y se volvió a mezclar con ayuda del vórtex. Enseguida se colocó la mezcla en una columna de centrifugación DNeasy Mini y se centrifugó a 8,000 rpm durante un minuto, posteriormente se retiró el tubo de recolección y la columna se colocó en un nuevo tubo de recolección. Se adicionó 500 µl de Buffer AW1 y se centrifugó de nuevo durante un minuto a 8,000 rpm, se descartó el tubo de recolección. La columna se colocó a un tubo nuevo y se adicionó 500 µl de Buffer AW2. Se centrifugó durante tres minutos a 14,000 rpm para lavar la membrana DNeasy, se descartó el tubo de recolección. Se trasladó la columna de centrifugación DNeasy Mini a un tubo eppendorf de 1.5 ml, y se agregaron 200 µl de Buffer AE directamente sobre la membrana DNeasy. Se incubó a temperatura ambiente durante un minuto y se centrifugó a 8,000 rpm durante un minuto para eluir el DNA. Finalmente, se quitó la columna y se obtuvo el DNA en el tubo eppendorf, la cual se guardó a -20° C hasta su uso.

7.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa [PCR]

Para la detección de *Anaplasma* y *Ehrlichia* se amplificó un fragmento de 345 pb del gen 16S-rRNA utilizando los oligonucleótidos *EHR16SD* y *EHR16SR* previamente

reportados en el trabajo de Parola [cuadro 4] (Parola *et al.*, 2000). Para la amplificación se realizó de reacción que consistió de 12.5 µl de Go Taq® Green Master Mix de Promega Corporation [Madison, WI, USA], 1 µl de cada primer, 8.5 µl de agua libre de nucleasas y 2 µl de DNA [200 ng], de esta forma se obtuvo un volumen final de 25 µl en cada tubo de PCR. Para cada reacción se incluyó un control positivo [*Ehrlichia canis*, obtenido de un perro del estado de Veracruz] y un control negativo [agua]. El ciclaje utilizado consistió: un ciclo inicial a 94°C por dos minutos seguido de 35 ciclos de 1.30 minutos a 94°C, un minuto a 54°C y 1.35 minutos a 74°C, con una extensión final de cinco minutos a 74°C. Finalmente, los productos de PCR fueron almacenados a -20°C.

Cuadro 4. Oligonucleótidos reportados por Parola *et al.*, 2000.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
EHR16SD	GGTACCYACAGAAGAAGTCC
EHR16SR	TAGCACTCATCGTTACAGC

7.2.3 Electroforesis

Los productos de PCR fueron corroborados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% y visualizados usando el equipo ODYSSEY CLx Imaging System [LICOR Biosciences]. A los geles se les agregó 1.5 µl del fluorocromo SYTO 60 y 2 µl de marcador de peso molecular LMW DNA Ladder. Los geles se corrieron por 40 minutos a 85 V.

7.2.4 Secuenciación

Todas las muestras positivas se secuenciaron en Macrogen Inc. [Corea del Sur].

7.2.5 Reconstrucción filogenética

Con las secuencias obtenidas se realizó un alineamiento local mediante el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool [BLAST, por sus siglas en inglés] en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica [NCBI, por sus siglas en inglés]) para buscar secuencias previamente reportadas que fueran similares a las obtenidas en este trabajo. Posteriormente, se realizó un alineamiento global utilizando secuencias disponibles en Genbank de las especies: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *E. ruminantium*, *A. bovis*, *A. centrale*, *A. marginale*, *A. ovis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* y finalmente *Rickettsia rickettsii* y *Candidatus Wolbachia brouquii* como grupos externos [cuadro 5]. El alineamiento se realizó mediante el algoritmo de Clustal W en el programa Mega 7. Posteriormente se utilizó el programa PhyML 3.0 para obtener el modelo de sustitución de nucleótidos, para esto se utilizó la selección automática de modelos a través de la selección de modelo inteligente [SMS, por sus siglas en inglés] mediante el criterio de información bayesiana [BIC, por sus siglas en inglés]. Se generó una hipótesis filogenética utilizando el método de Máxima Verosimilitud con 10,000 réplicas de Bootstrap. Y finalmente se calcularon las distancias pareadas.

Cuadro 5. Secuencias de referencia obtenidas de GenBank utilizadas para el alineamiento global.

Especie	Vector/Hospedero	País	No. de accesión
<i>A. bovis</i>	Cabra	China	KP062956.1
<i>A. centrale</i>	<i>Cervus nippon</i>	Japón	AB588977.2
<i>A. marginale</i>	<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	China	KU586066.1
<i>A. ovis</i>	Oveja	Nigeria	KY938509.1
<i>A. phagocytophilum</i>	Cabra	China	KP062963.1
<i>A. platys</i>	Perro	Japón	AF536828.1
Uncultured <i>Anaplasma</i> sp.	Garrapata	China	KF728353.1
<i>E. canis</i>	Perro	Estados Unidos	CP000107.1
<i>E. chaffeensis</i>	Cabra	China	KX505292.1
<i>E. ewingii</i>	Perro	Estados Unidos	U96436.1
<i>E. muris</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>	Estonia	KU535865.1
<i>E. ruminantium</i>	ND	Sudáfrica	NR074155.1
<i>R. rickettsii</i>	<i>Homo sapiens</i>	Estados Unidos	DQ150694.1
<i>Candidatus</i> <i>Wolbachia brouquii</i>	<i>Sergentomyia minuta</i>	Francia	DQ402520.1

8. RESULTADOS

8.1 Colecta de Hospederos

En las dos localidades (Rancho Santa Elena y Rancho Cruxtitla) se recolectaron un total de 40 mamíferos pequeños, 35 roedores de dos familias: Cricetidae [*Peromyscus beatae* 26 y *Reithrodontomys sumichrasti* 2] y Muridae [*Mus musculus* 4 y *Rattus norvegicus* 3]; una musaraña [*Sorex ventralis*] de la familia Soricidae y cuatro murciélagos [*Myotis velifer*] de la familia Vespertilionidae. En el Rancho Santa Elena se recolectaron un total de 27 mamíferos: *P. beatae* 20, *M. velifer* 4, *R. sumichrasti* 2 y un ejemplar de *S. ventralis*. Mientras que en el Rancho Cruxtitla se recolectaron 13 mamíferos: *P. beatae* 6, *R. norvegicus* 3 y *M. musculus* 4 [Cuadro 6].

Cuadro 6. Hospederos recolectados por localidad.

Localidad	Familia	Especie	No. de individuos
Rancho Santa Elena	Cricetidae	<i>P. beatae</i>	20
		<i>R. sumichrasti</i>	2
	Vespertilionidae	<i>M. velifer</i>	4
	Soricidae	<i>S. ventralis</i>	1
TOTAL			27
Rancho Cruxtitla	Cricetidae	<i>P. beatae</i>	6
	Muridae	<i>R. norvegicus</i>	3
		<i>M. musculus</i>	4
TOTAL			13

8.2 Detección de *Anaplasma* y *Ehrlichia*

Se detectaron muestras positivas en la electroforesis al mostrar bandas de 350 pb para *Anaplasma* y *Ehrlichia* en las muestras analizadas de los mamíferos recolectados [Imagen 10]. En total 11 muestras de las 40 totales resultaron positivas, por lo cual se obtuvo una prevalencia de infección global del 27.5%, de los 27 mamíferos recolectados en el municipio de Huasca de Ocampo cinco fueron positivos [*P. beatuae* 3, *R. sumichrasti* 1 y *S. ventralis* 1] lo que corresponde a una prevalencia local del 12.5% mientras que de los 13 mamíferos recolectados en el municipio de Mineral del Monte seis fueron positivos [*P. beatuae* 4 y *M. musculus* 2] lo que representa una prevalencia de infección del 15%. El 17.5% de prevalencia de la infección corresponde a *P. beatuae*, la cual fue la especie con mayor infección para ambas localidades. El 5% fue para *M. musculus* en el municipio de Mineral del Monte y el 2.5% corresponde a *R. sumichrasti* y *S. ventralis* para cada especie, recolectados en Huasca de Ocampo [Cuadro 7].

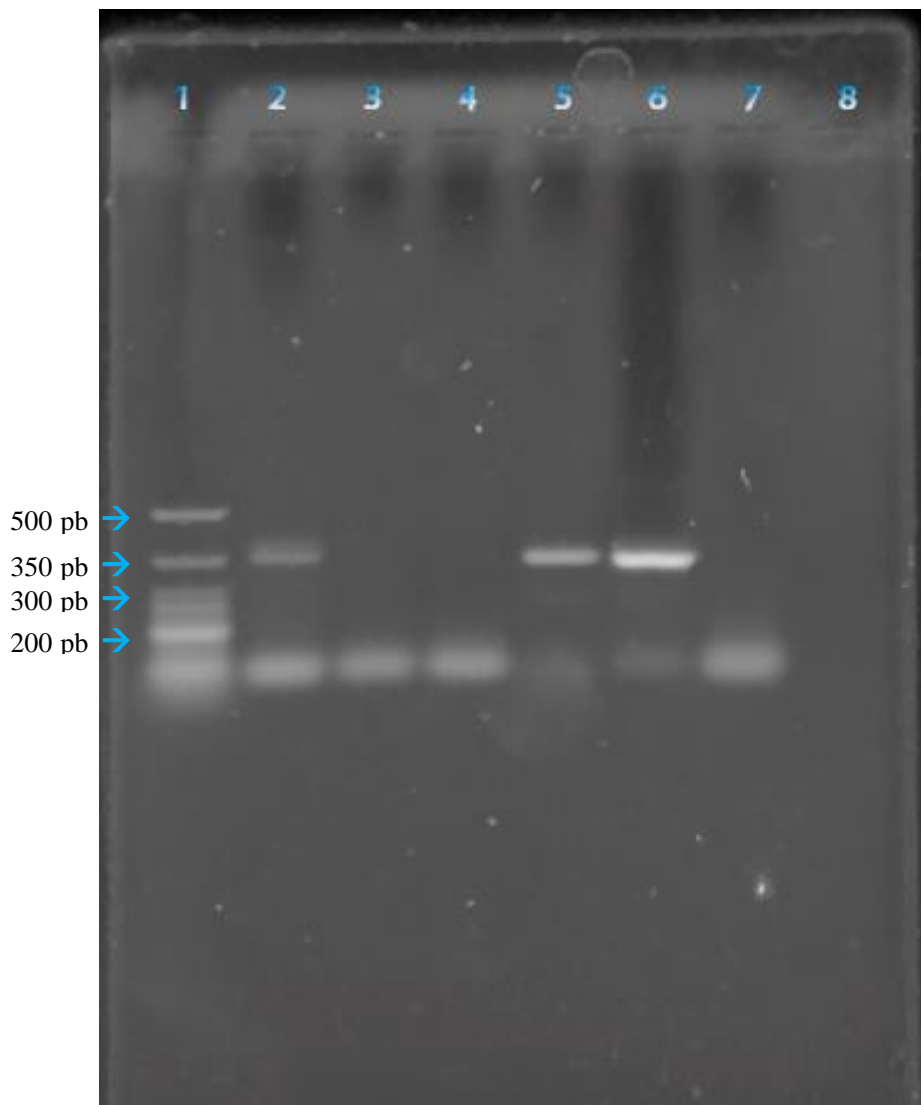


Imagen 10. Electroforesis de los productos de PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular LMW. Carril 2 y 5: Muestras positivas. Carril 6: Control positivo de *Anaplasma* y *Ehrlichia*. Carril 7: control negativo.

Cuadro 7. Prevalencia de *Anaplasma* en los mamíferos recolectados.

Localidad	Especie	No. de individuos recolectados	No. de individuos infectados	Prevalencia %
Rancho Santa Elena	<i>P. beatae</i>	20	3	12.5
	<i>R. sumichrasti</i>	2	1	
	<i>S. ventralis</i>	1	1	
	<i>M. velifer</i>	4	0	
Rancho Cruxtitla	<i>P. beatae</i>	6	4	15
	<i>M. musculus</i>	4	2	
	<i>R. norvegicus</i>	3	0	

8.3 Reconstrucción filogenética

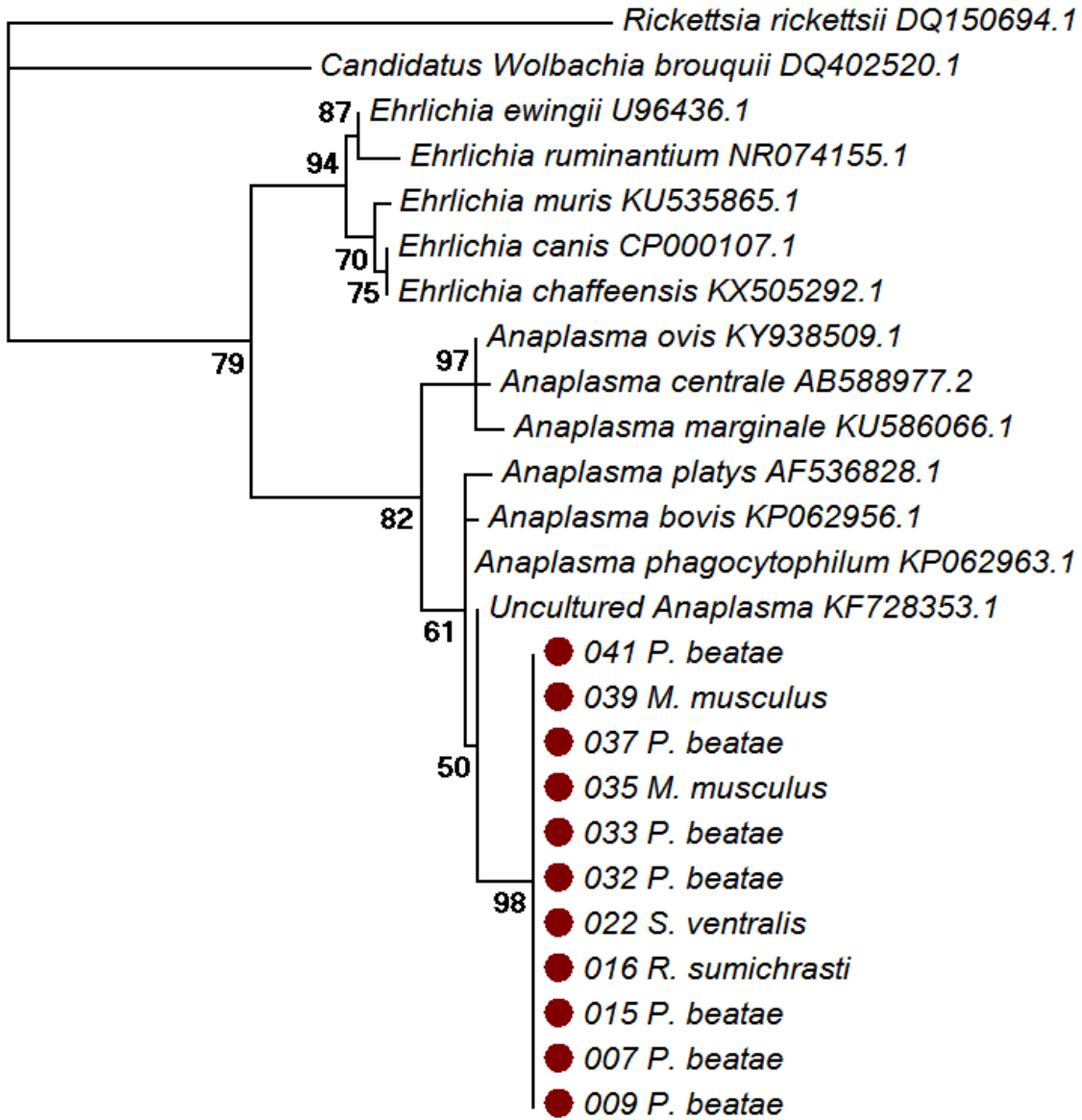
Después de obtener la secuenciación de las muestras positivas provenientes de *M. musculus*, *P. beatae*, *R. sumichrasti* y *S. ventralis* se realizó Basic Local Alignment Search Tool [BLAST, por sus siglas en inglés], con la finalidad de comparar las secuencias obtenidas con las de referencia que se encuentran en Genbank. Las 11 secuencias obtenidas mostraron porcentajes de similitud del 98% con *Anaplasma* sp [KF728353.1] y ninguna de ellas mostró similitud con *Ehrlichia* [Cuadro 8].

Cuadro 8. Resultados de BLAST

Hospederos	Especies de <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> de detectadas (Similitud)	País	No. de Acceso
<i>M. musculus</i>	98% <i>Anaplasma</i> sp.	China	KF728353.1
<i>P. beatae</i>	98% <i>Anaplasma</i> sp.	China	KF728353.1
<i>R. sumichrasti</i>	98% <i>Anaplasma</i> sp.	China	KF728353.1
<i>S. ventralis</i>	98% <i>Anaplasma</i> sp.	China	KF728353.1

Se generó un árbol filogenético por el método de Máxima Verosimilitud, en este análisis se pudieron observar dos grandes grupos, el primero de ellos integrado por todas las especies del género *Ehrlichia*. El segundo grupo se encuentra compuesto por todas las especies del género *Anaplasma*, utilizando el gen 16s rRNA no se resuelve de buena manera el árbol filogenético ya que se generaron politomias, pero algo evidente es la agrupación de todas las secuencias obtenidas en este trabajo [Círculos rojos], lo cual hace referencia a que son idénticas entre sí ya que todas se agrupan en un mismo clado con un valor de bootstrap de 98, la siguiente secuencia con la que tienen más similitud todas las secuencias obtenidas

es Uncultured *Anaplasma* sp. [KF728353.1] con un valor de bootstrap de 50, seguido de *A. phagocytophilum* con un valor de bootstrap de 61 [Imagen 11].



0.02

Imagen 11. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud generado con el gen 16S rRNA, basado en el modelo de sustitución de nucleótidos K80+G. Los soportes de los clados se evaluaron mediante 10,000 réplicas de Bootstrap. Los círculos rojos señalan las secuencias obtenidas de los hospederos recolectados

Cuadro 9. Matriz de distancias genéticas. En esta tabla se puede observar que las secuencias provenientes de los mamíferos recolectados muestran una mayor similitud con 2 secuencias: secuencia no cultivada de *Anaplasma* sp. y *Anaplasma phagocytophilum*.

	<i>R. ri</i>	<i>C. Wo</i>	<i>E. ca</i>	<i>E. cha</i>	<i>E. ew</i>	<i>E. mu</i>	<i>E. ru</i>	<i>A. bo</i>	<i>A. ce</i>	<i>A. ma</i>	<i>A. ov</i>	<i>A. pl</i>	<i>A. ph</i>	<i>U. An</i>	<i>P. b</i>	<i>M. m</i>	<i>P. b</i>	<i>M. m</i>	<i>P. b</i>	<i>P. b</i>	<i>S. v</i>	<i>R. s</i>	<i>P. b</i>	<i>P. b</i>	<i>P. b</i>		
1	<i>R. rickettsii</i>																										
2	<i>C. Wolbachia</i>	0.207																									
3	<i>E. canis</i>	0.262	0.165																								
4	<i>E. chaffeensis</i>	0.262	0.165	0.000																							
5	<i>E. ewingii</i>	0.264	0.166	0.016	0.016																						
6	<i>E. muris</i>	0.279	0.178	0.008	0.008	0.016																					
7	<i>E. ruminantium</i>	0.256	0.186	0.028	0.028	0.012	0.028																				
8	<i>A. bovis</i>	0.241	0.211	0.088	0.088	0.089	0.099	0.105																			
9	<i>A. centrale</i>	0.249	0.218	0.099	0.099	0.089	0.099	0.105	0.037																		
10	<i>A. marginale</i>	0.241	0.211	0.104	0.104	0.105	0.104	0.122	0.041	0.012																	
11	<i>A. ovis</i>	0.241	0.211	0.094	0.094	0.094	0.094	0.111	0.032	0.004	0.008																
12	<i>A. platys</i>	0.233	0.211	0.099	0.099	0.100	0.110	0.105	0.012	0.037	0.041	0.032															
13	<i>A. phagocytophilum</i>	0.233	0.204	0.094	0.094	0.094	0.104	0.111	0.004	0.032	0.037	0.028	0.008														
14	<i>U. Anaplasma</i>	0.227	0.198	0.093	0.093	0.094	0.104	0.110	0.008	0.032	0.037	0.028	0.012	0.004													
15	<i>P. beatae</i>	0.244	0.210	0.102	0.102	0.103	0.108	0.120	0.024	0.045	0.049	0.041	0.028	0.020	0.016												
16	<i>M. musculus</i>	0.244	0.210	0.102	0.102	0.103	0.108	0.120	0.024	0.045	0.049	0.041	0.028	0.020	0.016	0.000											
17	<i>P. beatae</i>	0.244	0.210	0.102	0.102	0.103	0.108	0.120	0.024	0.045	0.049	0.041	0.028	0.020	0.016	0.000	0.000										
18	<i>M. musculus</i>	0.244	0.210	0.102	0.102	0.103	0.108	0.120	0.024	0.045	0.049	0.041	0.028	0.020	0.016	0.000	0.000	0.000									
19	<i>P. beatae</i>	0.244	0.210	0.102	0.102	0.103	0.108	0.120	0.024	0.045	0.049	0.041	0.028	0.020	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000								
20	<i>P. beatae</i>	0.244	0.210	0.102	0.102	0.103	0.108	0.120	0.024	0.045	0.049	0.041	0.028	0.020	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000							
21	<i>S. ventralis</i>	0.244	0.210	0.102	0.102	0.103	0.108	0.120	0.024	0.045	0.049	0.041	0.028	0.020	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
22	<i>R. sumichrasti</i>	0.244	0.210	0.102	0.102	0.103	0.108	0.120	0.024	0.045	0.049	0.041	0.028	0.020	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000				
23	<i>P. beatae</i>	0.244	0.210	0.102	0.102	0.103	0.108	0.120	0.024	0.045	0.049	0.041	0.028	0.020	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
24	<i>P. beatae</i>	0.244	0.210	0.102	0.102	0.103	0.108	0.120	0.024	0.045	0.049	0.041	0.028	0.020	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
25	<i>P. beatae</i>	0.244	0.210	0.102	0.102	0.103	0.108	0.120	0.024	0.045	0.049	0.041	0.028	0.020	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

El análisis de distancias genéticas incluyó un total de 25 secuencias y se generó mediante el modelo K80+ G [Cuadro 9]. La matriz mostró que las 11 secuencias obtenidas en este trabajo y las de referencia muestran un intervalo de distancia que va desde 0.000 a 0.279, las distancias que hay dentro del género *Anaplasma* van de 0.004 a 0.041, mientras que las distancias que se presentan dentro del género *Ehrlichia* van de 0.000 a 0.028. Al comparar las secuencias obtenidas en este trabajo contra el género *Ehrlichia* se obtienen distancias que van de 0.102 a 0.120, mientras que al compararlas con *Anaplasma* las distancias van de 0.016 a 0.045. Las especies con mayor distancia genética son *A. marginale* y *E. ruminantium* [0.122] mientras que las secuencias con menor distancia fueron *A. phagocytophilum* y Uncultured *Anaplasma* [0.004]. Uncultured *Anaplasma* a su vez muestra una continua distancia genética con todas las secuencias obtenidas en este trabajo [0.016]. Finalmente se identificó que las muestras obtenidas en este trabajo tienen una menor distancia genética con la especie *A. phagocytophilum* [0.020].

9. DISCUSIÓN

México alberga alrededor del 11% [544 especies] de la diversidad de mamíferos a nivel mundial, colocando al país en tercer lugar solo por debajo de Indonesia y Brasil respectivamente, a pesar de que el país cuenta con una extensión de apenas el 1.6% de la superficie continental del planeta (Llorente y Ocegueda, 2008; Ceballos G., 2014). A su vez estos mamíferos son parasitados por una gran diversidad de ectoparásitos, por ejemplo, los de la subclase Acari [ácaros y garrapatas], los cuales constituyen un grupo megadiverso en México, con 2,625 especies. Dentro del orden Ixodida se incluye a especies conocidas comúnmente como garrapatas las cuales se caracterizan por ser parásitos, de todas las clases de vertebrados terrestres, siendo al mismo tiempo vectores de patógenos bacterianos y virales (Pérez *et al.*, 2013).

El estado de Hidalgo alberga en total 154 especies de mamíferos (Mejenes *et al.*, 2010) de los cuales se recolectaron seis especies [3.86 de la riqueza de mamíferos para el estado] en el presente trabajo. En el Rancho Santa Elena se recolectaron cuatro especies [*P. beatae*, *R. sumichrasti*, *S. ventralis* y *M. velifer*], los cuales presentan hábitos nocturnos y habitan en bosques mesófilos y bosques húmedos, en el Eje Volcánico Transversal, una porción de la Sierra Madre Oriental y otra porción de la Sierra Madre del Sur (Ceballos G., 2014). En el Rancho Cruxtitla se recolectaron tres especies [*P. beatae*, *R. norvegicus* y *M. musculus*], estas últimas dos se encuentran fuertemente asociadas a poblaciones humanas, por lo tanto, su distribución en México se puede ver reflejada en la distribución misma de los núcleos poblacionales y se considera que se pueden distribuir hasta dos o tres kilómetros alrededor de cada núcleo poblacional. Se localizan casi en cualquier tipo de vegetación y ambientes urbanos específicamente en hoyos, rocas, troncos y pilas de basura o desperdicios

y tienen efectos de amenaza contra la salud de las personas, animales domésticos y animales de vida silvestre ya que son portadoras de numerosas enfermedades y parásitos transmisibles entre la fauna silvestre y los seres humanos (Álvarez *et al*, 2008). De las seis especies recolectadas cuatro resultaron positivas para *Anaplasma*. En primer lugar *S. ventralis*, es una especie de la cual no se sabe mucho de su biología, ha sido capturada en algunos bosques de coníferas, su dieta incluye invertebrados, semillas, musgos y ocasionalmente carroña (Ceballos G., 2014). Este es el primer reporte de *Anaplasma* infectando a *S. ventralis*, sin embargo, existen trabajos en los cuales se ha detectado *A. phagocytophilum* en las especies *Sorex araneus* y *Sorex minutus*, las cuales tienen distribución en Europa, sin embargo, no existen reportes de *A. phagocytophilum* en ninguna especie del género *Sorex* en México (Matei *et al.*, 2018). En segundo lugar *R. sumichrasti*, tampoco presenta reportes previos con *Anaplasma*, sin embargo, hay trabajos en los cuales se ha detectado la presencia de *A. phagocytophilum* en *Reithrodontomys megalotis* en el oeste de Estados Unidos y en *Reithrodontomys fulvescens* en México (Foley *et al.*, 2008; Nieto *et al.*, 2007; Sosa *et al*, 2014). Para el caso del género *Peromyscus* no existen reportes *A. phagocytophilum*, infectando a *P. beatae*, sin embargo, se tienen reportes de *P. leucopus* infectados por *A. phagocytophilum* en Estados Unidos e incluso se han realizado estudios experimentales y en campo para incriminarlo como reservorio (Massung *et al.*, 2004). Adicionalmente en México otras especies de *Peromyscus* [*P. leucopus*, *P. maniculatus* y *P. hylocetes*] han sido reportadas portando *A. phagocytophilum* en distintos estados de la Republica (Sosa *et al*, 2014). Para el caso de *M. musculus*, existen reportes de esta especie infectada por *A. phagocytophilum* en distintos estados de México (Sosa *et al*, 2014). La mayoría de estas especies de roedores pueden alcanzar una elevada densidad poblacional, explotando una amplia gama de hábitats lo que justifica su importancia epidemiológica, como hospederos de

mantenimiento de patógenos, que a su vez pueden transmitirse a garrapatas y estas infectar de manera accidental al ser humano. Además especies como *R. norvegicus* y *M. musculus* son considerados mamíferos sinantrópicos ya que prosperan en lugares donde los humanos están presentes, tanto en condiciones rurales como urbanas y son componentes importantes en la ecología de la transmisión de diferentes patógenos, generalmente las especies silvestres como *Peromyscus* se encuentran asociadas a garrapatas y al convivir las especies silvestres con especies sinantrópicas hace posible que los patógenos puedan llegar a afectar a los seres humanos, además los ectoparásitos agregan una dimensión de complejidad para la ecología de enfermedades. Existe evidencia de que los patógenos transmitidos por garrapatas se encuentran asociados con mamíferos silvestres cercanos a áreas antropogénicas (Hornok *et al.*, 2015; Bermúdez *et al.*, 2017).

Pese a que las garrapatas son los principales vectores de los miembros del género *Anaplasma*, en el presente trabajo no se recuperaron estos artrópodos en los hospederos analizados. Numerosos estudios han confirmado como principales vectores de *Anaplasma* a *I. ricinus* [Europa, África], *R. sanguineus s.l.* [Sur de Europa, Norte de África, India, Estados Unidos], e *I. persulcatus* [Asia]. En América, más frecuentemente reportadas como vectores son *I. scapularis*, *I. pacificus*, *A. americanum*, *D. variabilis*, *D. andersoni* y *R. sanguineus s.l.* (Rymaszewska & Grenda 2008). En México existen registros de 11 especies de *Dermacentor* distribuidas en 31 de los 32 estados del país, la mayoría de las especies que pertenecen a este género son parásitos de hospederos mamíferos. De las 11 especies registradas para México dos [*D. andersoni* y *D. variabilis*] son las que con mayor frecuencia se han reportado como vectores de *Anaplasma* además estas dos especies de garrapatas se han reportado parasitando roedores de los géneros *Peromyscus* y *Liomys* en México (Guzmán *et al.*, 2016). Para el género *Amblyomma* se tienen registradas 26 especies para México, de

las cuales [*A. americanum*] esta reportada como vector importante de *Anaplasma*. En nuestro país el género *Amblyomma* se ha registrado en 30 de los 32 estados del país y *A. americanum* se ha reportado parasitando mamíferos como *Bos taurus*, *Equus caballus* y *Canis familiaris* (Guzmán *et al.*, 2011). En contraparte el género *Ixodes* registra 26 especies para México, parasitando 28 especies de vertebrados [23 especies de mamíferos y cinco de aves], en 21 de los 32 estados del país. Particularmente se tiene registro de *I. scapularis* e *I. pacificus*, dos de las especies con mayor frecuencia reportadas como vectores de *Anaplasma*, parasitando mamíferos domésticos [*Canis familiaris* y *Bos taurus*]. Además, los géneros de roedores *Peromyscus* y *Sciurus* se han registrado como hospederos de varias especies de *Ixodes* (Guzmán *et al.*, 2007). En cuanto al género *Rhipicephalus* no existe un trabajo en México en el cual se detalle sobre la distribución de estas garrapatas, sin embargo, existen reportes sobre tres especies, *Rhipicephalus sanguineus* s.l. generalmente encontrada en perros, pero de igual forma puede parasitar otros mamíferos e incluso humanos (Rubio *et al.*, 2015). *Rhipicephalus microplus* una especie de gran importancia económica por afectar principalmente al ganado (Pérez *et al.*, 2010). Y *Rhipicephalus annulatus* es otra especie de importancia económica ya que también afecta al ganado (Almazán *et al.*, 2018).

En lo referente a las secuencias obtenidas de *Anaplasma* existe la posibilidad de que se trate de un nuevo linaje o variante, sin embargo, con los análisis presentados en este trabajo no es posible saberlo debido al pequeño tamaño del fragmento del gen 16S-rRNA analizado. Las secuencias obtenidas son muy parecidas a las de la especie *A. phagocytophilum*, agente etiológico de la anaplasmosis granulocítica humana. Sin embargo, aun a pesar los argumentos y pruebas que apoyan la clasificación actual de *A. phagocytophilum* su taxonomía sigue sin estar clara, ya que se ha observado una considerable variación genética entre diferentes cepas de esta especie, obteniendo así hasta 15 variantes con probabilidad de estar involucradas en

distintos ciclos epidemiológicos (Dugat *et al.*, 2015). Por ejemplo, hay dos variantes principalmente estudiadas de *A. phagocytophilum* [Ap-V1 y Ap-ha], las cuales pueden coexistir en mismas áreas geográficas y transmitirse por los mismos vectores, pero se segregan según los hospederos vertebrados que pueden infectar (Courtney *et al.*, 2003). De hecho *Odocoileus virginianus* es un importante reservorio de la variante Ap-V1, mientras que *P. leucopus* es un importante reservorio de la variante Ap-ha, una variante que es patógena para humanos, caballos y perros mientras que Ap-V1 nunca se ha implicado en infecciones humanas, algunas de las secuencias obtenidas en este trabajo provienen de *P. beatae*, por inferencia filogenética es probable que se trate de la variante Ap-ha lo cual aumenta el riesgo de infección para las personas y animales domésticos de las dos zonas muestreadas (Massung *et al.*, 2003).

Es importante destacar que la propagación de la infección por *A. phagocytophilum* en las poblaciones de vertebrados va a depender en primer lugar de la presencia de la bacteria la cual ya se ha detectado en varios estados de México, en segundo lugar, de los hospederos susceptibles y de la presencia de los vectores competentes (Dugat *et al.*, 2015). Es posible que linaje de *Anaplasma* encontrado en este trabajo pueda ser transmitido a humanos y producir síntomas similares a los producidos por *A. phagocytophilum*. El potencial zoonótico de este nuevo linaje se incrementa debido a la presencia de vectores como los del género *Ixodes*, que han sido reportado en 21 de los 32 estados de México, y que a nivel mundial es el género que con mayor frecuencia ha sido reportado como garrapata portadora y transmisora de *A. phagocytophilum*, aunado al amplio rango de mamíferos silvestres [*Peromyscus*] y sinantrópicos [*Mus musculus*] que tienen la capacidad de actuar como hospederos o reservorios (Rar y Golovljova, 2011; Stuen *et al.*, 2013; Gaff *et al.*, 2014).

Otro factor a considerar es la urbanización, ya que altera la composición de las comunidades de vida silvestre, conduce a la pérdida de biodiversidad y aumenta la abundancia de especies que prosperan en áreas urbanas, esto puede influir en la transmisión de algunas enfermedades transmitidas por vectores a través de un proceso denominado “efecto de dilución”. Al disminuir la diversidad de los hospederos aumenta la abundancia de los principales hospederos de mantenimiento, cuando esto sucede los patógenos también se vuelven abundantes y esto facilita la aparición de brotes de enfermedades (Bradley & Altizer, 2006).

Este estudio representa el primer acercamiento al estudio de las especies del género *Anaplasma* en el estado de Hidalgo, en el cual se trabajó únicamente con los mamíferos pequeños de la zona, sin embargo, resulta de vital importancia incrementar los esfuerzos de vigilancia para la detección de garrapatas, la notificación de casos humanos y el mantenimiento de información precisa sobre el riesgo general de exposición humana a las garrapatas y sus patógenos asociados para informar la atención clínica y las medidas de salud pública con la perspectiva integral de “Un mundo, Una Salud”.

10. CONCLUSIONES

- ❖ Este trabajo representa el primer reporte molecular de la presencia de *Anaplasma* sp. en mamíferos pequeños del estado de Hidalgo, México.
- ❖ De las 40 muestras analizadas, 11 resultaron positivas, lo cual representa una prevalencia del 27.5% de *Anaplasma* en mamíferos pequeños del estado de Hidalgo.
- ❖ Se detectó un posible nuevo linaje o variante de *Anaplasma* emparentado con *A. phagocytophilum*.
- ❖ Se detectó una prevalencia de 17.5% de este linaje en roedores de la especie *P. beatae*.

11. BIBLIOGRAFIA

Almazán C., Medrano C., Ortiz M., & de la Fuente J. (2008) Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from an outbreak of bovine anaplasmosis in an endemic area. *Veterinary Parasitology*, 158: 103-109.

Almazán C., González V. H., Fernández I., Cabezas A., Rodríguez R. & de la Fuente J. (2016) Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7: 276-283.

Almazán C, Tipacamu GA, Rodriguez S, Mosqueda J, Perez de Leon A. (2018) Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Front Biosci*, 23: 1535-1551.

Álvarez Romero, J., Medellín R. A., Oliveras A., Gómez H. & Sánchez O. (2008) Animales exóticos en México: una amenaza para la biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, UNAM, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México, D.F., 518 pp.

Bauerfeind R., Graevenitz A. V., Kimmig P., Schiefer H. G., Schwarz T., Slenczka W. & Zahner H. (2016) Zoonoses. Infectious diseases transmissible from animals to humans. *American Society for Microbiology*, Washington, DC, USA, 532 pp.

Bermúdez S.E., Gottdenker N., Krishnavajhala A., Fox A., Wilder H.K., Gonzalez K., Smith D., López M., Perea M., Rigg C., Montilla S., Calzada J., Saldaña A., Caballero C. & Lopez J. (2017) Synanthropic Mammals as Potential Hosts of Tick-Borne Pathogens in Panama. *PLOS ONE* 12(1): e0169047.

Bradley C. A., Altizer S. (2007) Urbanization and the ecology of wildlife diseases. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 2: 95-102.

Ceballos, G. (2014). Mammals of Mexico, *Johns Hopkins University Press*, Baltimore, Maryland. 974 pp.

Courtney, J. W., Dryden, R. L., Montgomery, J., Schneider, B. S., Smith, G., & Massung, R. F. (2003) Molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis* ticks from Pennsylvania. *Journal of clinical microbiology*, 41(4), 1569–1573. doi:10.1128/jcm.41.4.1569-1573.2003

Cossío R., Rodríguez S. D., García M. A., García D. & Aboytes R. (1997) Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, 32: 165-170.

Díaz O. C., Bolio M. E., Rodríguez R. I., Gutiérrez E. J. & Pérez C. (2016) Molecular survey of *Ehrlichia canis* in dogs from Mexico: prevalence of infection and possible associated factors. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 3: 251-257.

Dugat, T., Lagrée, A. C., Maillard, R., Boulouis, H. J., & Haddad, N. (2015) Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, 61. doi:10.3389/fcimb.2015.00061

Dumler, J. S., Barbet A. F., Bekker C. P., Dasch G. A., Palmer G. H., Ray S. C., & Rurangirwa F. R. (2001) Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 51: 2145-2165.

Fernández M., Cantó G. J. & Aboytes R. (1995) Prevalencia de anticuerpos séricos en contra de *Babesia* spp y *Anaplasma marginale* en el municipio de Santiago Ixcuintla, Nayarit. *Veterinaria México*, 26: 407-409.

Figueroa J. V., Alvarez J. A., Ramos J. A., Vega C. A. & Buening G. M. (1993) Use of a multiplex polymerase chain reaction-based assay to conduct epidemiological studies on bovine hemoparasites in Mexico. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 46: 71-75.

Foley, J. E., Nieto, N. C., Adjemian, J., Dabritz, H., & Brown, R. N. (2008) Anaplasma phagocytophilum infection in small mammal hosts of Ixodes ticks, western United States. *Emerging infectious diseases*, 14(7), 1147–1150. doi:10.3201/eid1407.071599

Fragoso S. G. & Milián F. (1984) Prevalencia de anticuerpos contra *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. en la zona centro del estado de Guerrero. *Técnica Pecuaria México.*, 47: 133-136.

Gaff H. D., Kocan K. M., & Sonenshine D. E. (2014) Tick-Borne Rickettsioses II (Anaplasmataceae). In Roe, R. M., & Sonenshine, D. E., (ed), *Biology of Ticks Volume 2.* (p 220-239). New York: Oxford University Press.

Gannon W. L. & Sikes R. S. (2007) The Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy*, 88: 809-823.

García C. y Núñez L. (1996) Pancitopenia tropical en un perro. *Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Zootecnistas en Pequeñas Especies*, 7: 235-236.

García D., López M., Cossío R., García Z., García M., Domínguez P. & Aboytes R. (1996) Seroprevalencia de anaplasmosis en explotaciones bovinas de 18 municipios de la zona norte de Veracruz. *Técnica Pecuaria México*, 34: 38-45.

Glaser C., Christie L., & Bloch K. C. (2010) Chapter 10: Rickettsial and ehrlichial infections. *Handbook of Clinical Neurology*, 96: 143-158.

Gongóra R. A., Zavala J., Castro C. J. & González P. (1999) First Case of Human Ehrlichiosis in Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 5: 481.

Guzmán C., Robbins R. & Pérez T. (2007) The *Ixodes* (Acari: Ixodidae) of Mexico: parasite-host and host-parasite checklists. *Zootaxa*, 1553: 47-58.

Guzmán C., Robbins R., Guglielmone A., Montiel G. & Pérez T. (2011) The *Amblyomma* (Acari: Ixodida: Ixodidae) of Mexico: Identification Keys, Distribution and Hosts. *Zootaxa*, 2998: 16-38.

Guzmán C., Robbins R., Guglielmone A., Montiel G., Rivas G. & Pérez T. (2016) The *Dermacentor* (Acari, Ixodida, Ixodidae) of Mexico: hosts, geographical distribution and new records. *ZooKeys*, 569: 1-22.

Haro P., López G., Tinoco L., Rentería T. & Medina G. (2007) Seroprevalence and Traceback of Animals Suspected of Carrying *Ehrlichia canis*, in Dogs Attended in Veterinary Clinics in Mexicali, Baja California, Mexico. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6: 850-854.

Hornok, S., Földvári, G., Rigó, K., Meli, M.L., Gönczi, E., Répási, A., Farkas, R., Papp, I., Kontschán, J., Hofmann-Lehmann, R. (2015) Synanthropic rodents and their

ectoparasites as carriers of a novel haemoplasma and vector-borne, zoonotic pathogens indoors. *Parasites & vectors*, 8, 27.

INEGI (1997) Cuaderno Estadístico Municipal. Huasca de Ocampo, Estado de Hidalgo, México.

INEGI (1995) Cuaderno Estadístico Municipal. Mineral del Monte, Estado de Hidalgo, México

Jiménez M., Pérez C., Vado I., Rodríguez J. C. & Ortega A. (2009) Serological Survey of *Ehrlichia canis* in Stray Dogs from Yucatán, Mexico, Using Two Different Diagnostic Tests. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9: 209-211.

Jiménez R., Vega C. A., Oviedo N., Rojas E. E., García M. A., Preciado J. F., Rosario R., Domínguez D. I. & Rodríguez S. D. (2012) Diversidad genética de la región variable de los genes *msp1a* y *msp4* en cepas de *Anaplasma marginale* de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3: 373-387.

Kernif T., Leulmi H., Raoult D. & Parola P. (2016) Emerging Tick-Borne Bacterial Pathogens. In Scheld, W. M., Hughes J. M., & Whitley R. J., (ed), *Emerging infections 10*. (p 295-310). American Society for Microbiology Washington, D.C.

Lira J. J., Polanco D. J., Castañeda R. O., Ramos J. A., Lara E. J., Preciado J. F., Rojas C., Álvarez J. A., Bautista C. R. & Figueroa J. V. (2017) Prevalencia serológica y

molecular de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* en búfalos de agua mantenidos en zonas de alta incidencia de garrapatas. *Entomología mexicana*, 4: 627-632.

Llorente Bousquets, J. y Ocegueda S. (2008) Estado del conocimiento de la biota, en Capital natural de México, *Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio, México, 1:283-322.

López F., Fajardo J. & Cantó G. J. (1983) Prevalencia de anticuerpos contra anaplasmosis y babesiosis e incidencia de infección diaria de babesiosis en bovinos del municipio de Playa Vicente, Veracruz. *Técnica Pecuaria México*, 44: 82.

López F., Cantó G. J., Falcón A. & Aboytes R. (1984) Prevalencia de anaplasmosis y babesiosis en el centro experimental pecuario de Aldama, Tamaulipas. *Técnica Pecuaria México*, 46: 88-92.

López F., Fernández M., Aboytes R., Cantó G. J. & Escutia I. (1985) Prevalencia de anaplasmosis y babesiosis y determinación de la probabilidad diaria de babesiosis en bovinos del municipio de Villa Comaltitlan, Chiapas. *Técnica Pecuaria México*, 46: 92-97.

Martínez A., Salinas A., Martínez F., Cantu A. & Miller D. K. (1999) Serosurvey for selected disease agents in White-tailed Deer from Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 35: 799-803.

Martínez P. P., Bolio M. E., Rodríguez R. I., Gutierrez E., Pérez C., Villegas S. & Sauri C. (2016) Associated Factors to Seroprevalence of *Ehrlichia* spp. in Dogs of Quintana Roo, Mexico. *Journal of Tropical Medicine*, 1-6.

Massung, R.F., Priestley, R.A., Miller, N.J., Mather, T.N., & Levin, M.L. (2003) Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice. *The Journal of infectious diseases*, 188 (11):1757-63 .

Massung, R., Priestley A., R. & Levin, M. (2004) Transmission Route Efficacy and Kinetics of *Anaplasma phagocytophilum* Infection in the White-Footed Mouse, *Peromyscus leucopus*. *Vector borne and zoonotic diseases* (Larchmont, N.Y.). 4. 310-8. 10.1089/vbz.2004.4.310.

Matei, I. A., D'Amico, G., Ionică, A. M., Kalmár, Z., Corduneanu, A., Sándor, A. D., ... Mihalca, A. D. (2018) New records for *Anaplasma phagocytophilum* infection in small mammal species. *Parasites & vectors*, 11(1), 193. doi:10.1186/s13071-018-2791-y

Mejenes M., Hernández S.M., Barragán T., & Pacheco J. (2010) Los mamíferos en el Estado de Hidalgo, México. *Therya*. 1. 161-188. 10.12933/therya-10-19.

Morales F., García C., Rodríguez R. I. & Rodríguez R. (2016) Serosurvey of vector-borne diseases in the Mexican wolf (*Canis lupus baileyi*) in captivity. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 48: 129-131.

Motta Ramírez G.A., Montes K.E., Martínez M.J., López M.A., Pereyra A., Ontiveros A., Castillo J.A., Medina B., Aragón M. (2016) El bazo: cementerio de leucocitos y de conocimientos radiológicos. *Anales de Radiología México*, 15:58-69.

Movilla R., García C., Siebert S. & Roura X. (2016) Countrywide serological evaluation of canine prevalence for *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* (*sensu lato*), *Dirofilaria immitis* and *Ehrlichia canis* in Mexico. *Parasites & Vectors*, 9: 421-433.

Nagaraja R. T. & Walker D. H. (2015) Chapter 109 - *Ehrlichia*. In Tang Y. W., Sussman M., Liu D., Poxton I. & Schwartzman J. (ed.), *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition) (p 2011-2032). Boston, Unit Estates: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00109-8>.

Nieto, N.C., Dabritz, H.A., Foley, P., Drazenovich, N.L., Calder, L., Adjemian, J., Conrad, P.A., & Foley, J.E. (2007) Ectoparasite Diversity and Exposure to Vector-Borne Disease Agents in Wild Rodents in Central Coastal California. *Journal Medical of Entomology* 44(2): 328-335.

Núñez L. (2003) Seroprevalence study of *Ehrlichia canis* in Mexico. *Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Zootecnistas en Pequeñas Especies*, 14: 83-85.

Ondrej H., Radek S., Nieves A., Marie J., Jan P., José De La F., & Petr K. (2013) Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, 3: 1-15.

Osorno B. M., Solana P., Ristic M. y Serrano E. (1973) Estudio de una vacuna atenuada de *Anaplasma marginale* en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 24: 57-63.

Pat H., Rodríguez R. I., Bolio M. E., Villegas S. L. & Reyes R. (2015) Molecular Diagnosis of *Ehrlichia canis* in Dogs and Ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Yucatán, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, 52: 101-104.

Parola, P., V. Roux, J. L. Camicas, I. Baradji, P. Brouqui, & D. Raoult. (2000) Detection of ehrlichiae in African ticks by PCR. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene and International Health*. 94: 707–708.

Perez L. C., Rodriguez R., Ramirez G. & Miller R. J. (2010) First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Veterinary Parasitology*, 168: 165-169.

Pérez T. M., Guzmán C., Montiel G., Paredes R. & Rivas G. (2013) Biodiversity of Acari in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 399-407.

Rar V. & Golovljova I. (2011) Review: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus Neohrlichia*” bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infection, Genetics And Evolution*, 11: 1842-1861.

Rodríguez R. I., Cob L. A. & Domínguez J. L. (2000) Hemoparásitos en bovinos, caninos y equinos diagnosticados en el laboratorio de parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán. *Revista Biomedica*, 11: 277-282.

Rodríguez R. I., Albornoz R. E. & Bolio G. M. (2005) *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Veterinary Parasitology*, 127: 75-79.

Rubio M., Gaxiola S., Verdugo E. & Cota S. (2015) *Rhipicephalus sanguineus* on canines in Sinaloa, México. *Revista Electrónica Veterinaria* 16: 1- 10.

Rymaszewska A. & Grenda S. (2008) Bacteria of the genus *Anaplasma* – characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. *Veterinarni Medicina*, 11: 573-584.

Salinas J. A., Villavicencio R., Tamez B. V., Hernández J. J., Avalos R., Zarate J. J., Picón F. J. & Riojas V. M. (2014) Prevalence of anti-*Anaplasma phagocytophilum* antibodies among dogs from Monterrey, Mexico. *African Journal of Microbiology Research*, 8: 825-829.

Salinas J. A., Cantú M. A., Wong A., Hernández J. J., Avalos R., Zarate J. J., & Riojas V. M. (2015) Seroprevalence of *Ehrlichia canis* in dogs from Monterrey, Mexico. *African Journal of Microbiology Research*, 9: 1974- 1977.

Severo M. S., Pedra H.F., Nieves A., Kocan K. M. & de la Fuente J. (2015) Chapter 110 - *Anaplasma*, In Tang Y. W., Sussman M., Liu D., Poxton I. & Schwartzman J. (ed.), *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition) (p 2033-2042) Boston, Unit Estates: Academic Press.

Silva A. B., Pina S., Gabriel M. P., Mayoral A., Mayoral M. A., Pérez L., López J. & Pérez E. (2014) Infección humana asintomática por contacto con perros. Un caso de ehrlichiosis humana. *Gaceta Médica de México*, 150: 171-174.

Sosa C. G., Quintero M. T., Gaxiola S. M., Cota S., Esteve M. & Gordillo G. (2013) Frequency and Clinical Epidemiology of Canine Monocytic Ehrlichiosis in Dogs Infested with Ticks from Sinaloa, Mexico. *Journal of Veterinary Medicine*, 1-3.

Sosa C. G., Vargas M., Torres J. & Gordillo G. (2014) Tick-Borne Rickettsial Pathogens in Rodents from Mexico. *J. Biomedical Science and Engineering*, 7: 884-889.

Sosa C. G., Solorzano F., Walker D., Torres J., Serrano C. & Gordillo G. (2016) Fatal Monocytic Ehrlichiosis in Woman, Mexico, 2013. *Emerging infectious diseases*, 22: 871-874.

Sosa C. G., Quintero T., Vargas M. & Gordillo G. (2016) First phylogenetic analysis of *Ehrlichia canis* in dogs and ticks from Mexico. Preliminary study. *Revista MVZ Córdoba*, 21: 5569-5576.

Sosa C. G., Vargas M., Torres J. & Gordillo G. (2016) Tick-borne rickettsial pathogens in questing ticks, removed from humans and animals in Mexico. *Journal of Veterinary Science*, 17: 353-360.

Stuen, S., Granquist, E. G., & Silaghi, C. (2013) *Anaplasma phagocytophilum*--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 31. doi:10.3389/fcimb.2013.00031.

Tamez G. R., Zarate R. J. & Gordillo P. M. (2015) Presencia de *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma phagocytophilum*, en *Rhipicephalus sanguineus* en Monterrey, Nuevo León, México. *Revista Biomédica*, 73-74.

Tinoco L., Quiroz H., Quintero M. T., Rentería T. B., Barreras A., Hori S., López G., Tamayo A. R., Quezada V. A., Moro M. & Vinasco J. (2007) Seroprevalence of *Ehrlichia canis* in dogs from a Mexico-U. S Border Desert Region: Pilot study. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6: 758-760.

Walker D. H., & Ismail N. (2008) Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. *Nature Reviews. Microbiology*, 6: 375-386.

12. ANEXO I Diagnóstico y tratamiento para Anaplasmosis y Ehrlichiosis humanas

Anaplasmosis Granulocítica Humana

El diagnóstico de la anaplasmosis granulocítica humana puede hacerse cuando un paciente presenta una alta fiebre aguda, junto con escalofríos, mialgia y dolor de cabeza. Como evidencia de apoyo se puede incluir un historial de mordedura de garrapata, o exposición a las mismas. El diagnóstico se realiza a partir de un frotis sanguíneo, en donde se busca la presencia de células infectadas. La sensibilidad de esta prueba es alta durante la primera semana después de la infección [25 % – 75 %], esta sensibilidad también depende del microscopista; en algunos pacientes del 10 % al 20% de los neutrófilos. La punción lumbar se realiza con menos frecuencia, en esta prueba se observa si existen anomalías en el líquido cerebro espinal como pleocitosis linfocítica y elevación moderada en la concentración de proteínas. El serodiagnóstico de anaplasmosis granulocítica humana se obtiene cuando se produce una seroconversión o un cambio cuádruple en el título de anticuerpos es observado durante la fase de convalecencia. Esto requiere la detección de anticuerpos reactivos de *A. phagocytophilum* en cultivos celulares o bacterias purificadas fijadas en portaobjetos. Con anticuerpo polivalente, la detección muestra un alto rango de sensibilidad [83 % - 100%], los anticuerpos están presentes en una minoría de casos en el momento de la enfermedad además dado que los títulos de los anticuerpos pueden persistir durante meses o años especialmente en áreas endémicas, por lo tanto, un serodiagnóstico positivo debe presentarse con precaución. La Reacción en cadena de la polimerasa [PCR, por sus siglas en inglés] es actualmente la prueba más sensible para detectar *A. phagocytophilum*, depende de la amplificación de genes bacterianos a partir de sangre. La PCR múltiple en tiempo real es una mejora en el diagnóstico ya que reduce el tiempo requerido para el ensayo y facilita la detección de dos o más patógenos en una sola prueba. Otra posibilidad para el

diagnóstico es el aislamiento de la bacteria de sangre, el cultivo se realiza usando células promielocíticas de la leucemia humana [HL-60], dentro de las cuales las bacterias forman mórulas cinco días post-inoculación. Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta también se utilizan para el diagnóstico ya que son más sensibles en etapas posteriores de la infección (Glaser, 2010; Gaff, 2014; Severo, 2015).

La terapia actual recomendada es la administración de doxiciclina o tetraciclina por 5 a 14 días. La doxiciclina es la primera opción porque tiene menos efectos secundarios y se tolera de mejor forma, aunque existe un riesgo de decoloración dental en pacientes pediátricos. La acción de la doxiciclina es bacteriostática contra organismos rickettsiales. La dosis recomendada es de 100 mg para adultos y 2.2 mg/kg para niños de ocho años o más grandes, se administra por vía oral cada 12 horas, el tratamiento conduce a una marcada mejora del paciente en 24 a 48 horas. En adultos el tratamiento con doxiciclina debe continuarse por al menos 10 días o al menos durante tres días después de que la fiebre desaparece, en niños menores de 8 años se recomienda un régimen de 14 días, el tratamiento debe completarse hasta que haya un estado afebril por tres días y el resto del curso de los 14 días debe de completarse con un agente alternativo como la amoxicilina para minimizar el riesgo de decoloración dental. Los pacientes que no responden a la doxiciclina después de 72 horas deben ser evaluadas para un diagnóstico alternativo o la posibilidad de una coinfección de *Babesia*. Las pacientes embarazadas representan un reto ya que la doxiciclina está contraindicada, en esta población, así como en pacientes con una contraindicación específica, la doxiciclina puede ser sustituida con rifampicina [adultos: 300 mg, dos veces al día; niños: con un peso menor a 45.4 kg 10mg/kg dos veces al día] (Glaser, 2010; Gaff, 2014; Severo, 2015).

Ehrlichiosis Monocítica Humana

La examinación de un frotis de sangre es una manera rápida de diagnosticar esta enfermedad, pero este método es muy poco sensible ya que se presentan mórulas en solo alrededor del tres por ciento de los monocitos. La técnica de PCR es altamente sensible para la detección de *E. chaffeensis* hasta en un 85%, especialmente si es llevada a cabo durante la fase aguda de la enfermedad [generalmente dentro de la primera semana después del inicio de la sintomatología]. La PCR en tiempo real y la PCR múltiplex pueden ser aún más sensibles permitiendo la detección simultánea de diferentes agentes infecciosos y brindan resultados más rápidos. El serodiagnóstico a través de un ensayo de inmunofluorescencia indirecta es otra herramienta de diagnóstico más utilizada para confirmar Ehrlichiosis. Un aumento de cuatro veces en los títulos de IgM e IgG entre la fase aguda y la fase de convalecencia es considerado diagnóstico. Las bacterias también se pueden cultivar en laboratorios especializados pero el crecimiento lento de los cultivos limita el uso de este método para el diagnóstico clínico durante la fase aguda de la enfermedad (Glaser, 2010; Gaff, 2014).

El tratamiento recomendado es con doxiciclina, para adultos una dosis oral de 100 mg oralmente dos veces al día durante 14 días; la dosis para niños con un peso menor a 45.4 kg es de 2.2 mg/kg dos veces al día. La respuesta al tratamiento generalmente es rápida y los pacientes generalmente se vuelven afebriles en menos de tres días. Se recomienda seguir con el tratamiento durante al menos tres a cinco días después que la fiebre desaparece y por lo menos de 10 a 14 días en caso de afectación al sistema nervioso central (Glaser, 2010; Gaff, 2014).

Ehrlichiosis Granulocítica Humana

El diagnóstico de ehrlichiosis granulocítica humana se lleva a cabo mediante la visualización de mórulas intracitoplasmáticas en neutrófilos en el paciente. Las mórulas se pueden visualizar en sangre y rara vez en líquido cerebroespinal. No existe un ensayo serológico específico para *E. ewingii*, pero existe una reactividad cruzada significativa con *E. chaffeensis*. Existe la PCR específica para *E. ewingii*, pero se encuentra limitada a laboratorios de investigación, la sensibilidad es mayor en las primeras semanas de la enfermedad (Glaser, 2010).

No hay ensayos que evalúen el tratamiento de *E. ewingii*, sin embargo, la doxiciclina se considera como tratamiento para adultos y niños. Cuando la terapia con este agente se inicia de inmediato, los resultados son uniformes, la administración y dosificación es la misma que para la ehrlichiosis monocítica humana (Glaser, 2010).

13. ANEXO II Biología de los hospederos recolectados

Peromyscus beatae (Thomas, 1903)

Es un ratón de tamaño mediano, la longitud de su cola es similar a la longitud de su cuerpo. La coloración dorsal es café oscuro, con una franja abrupta a lo largo del centro de la espalda. Los lados son de color café tabaco con una tenue línea lateral de color naranja-amarillo que se extiende de las mejillas a las extremidades traseras. El vientre es bicolor, blanco en la punta con un mechón negro en la base, la cola es gris negruzco en la parte dorsal y blanca en la parte ventral. Las patas traseras son blancas pero oscuras por encima de los tobillos. Las orejas son de color café negruzco. Esta especie habita ambientes subhúmedos y húmedos como bosques de coníferas, bosques mixtos y bosque de roble, se encuentra desde los 1,371 msnm hasta los 3,810 msnm (Ceballos, 2014).



Figura 12. *Peromyscus beatae*. Vista dorsal.



Figura 13. *Peromyscus beatae*. Vista ventral



Figura 14. *Peromyscus beatae*. Vista lateral.

Reithrodontomys sumichrasti (Saussure, 1861)

Se caracteriza por un surco en los incisivos, por sus largas orejas, ojos prominentes y sobre todo por su cola larga y su tamaño más pequeño en comparación con otros géneros de ratones de campo. La coloración dorsal varía según la subespecie, va desde canela oscuro a gris y naranja, las mejillas y los costados son más oscuros. El vientre es generalmente más claro y varía de canela a marrón o rosa leonado a rosa canela. La cola es marrón o marrón oscuro en la parte posterior y más clara en la parte anterior. En las extremidades el tarso y el carpo son oscuros, pero la parte posterior de las patas traseras varía de blanco, canela y rosa a rosa canela. Vive en regiones templadas, pastizales, vegetación arbustiva, bosques de pino y roble, bosques nublados, bosques subtropicales con abundancia de helechos y musgos, campos de maíz y caña de azúcar y plantaciones de mango. Esta especie es más abundante en bosques fríos y húmedos, y se puede encontrar entre los 800 msnm y 3,200 msnm (Ceballos, 2014).



Figura 15. *Reithrodontomys sumichrasti*. Vista dorsal.



Figura 16. *Reithrodontomys sumichrasti*. Vista lateral



Figura 17. *Reithrodontomys sumichrasti*. Vista ventral.

Rattus norvegicus (Berkenhout, 1796)

La rata noruega presenta un pelaje áspero y grueso con prominentes orejas desnudas y cola prácticamente desnuda, que generalmente es más corta que el cuerpo y cabeza. El color, en general, es café o gris oscuro en las partes superiores, con pelos negros alternados y un color más claro grisáceo en el vientre. Las hembras tienen 12 mamas. Al igual que el resto de los roedores, posee cuatro incisivos, dos superiores y dos inferiores, carece de caninos y premolares anteriores lo que ocasiona que haya un diastema. Sus incisivos crecen durante toda su vida a partir de la base, que va sustituyendo la porción desgastada por la actividad de cortar y roer materiales duros. La parte exterior del diente es más dura y carece de nervio, salvo en la base. Esta especie es muy común en zonas urbanas, es posible encontrarlas asociadas a asentamientos humanos en donde haya disponibilidad de alimentos.

En construcciones, generalmente ocupa sótanos, áticos y pisos bajos, lo mismo que coladeras y basureros. Se caracteriza por ser una excelente nadadora y buceadora (Álvarez, 2008).

Mus musculus (Linnaeus, 1758)

El ratón casero es una especie de roedor pequeña, que no rebasa los 21 cm de largo total y se caracteriza por poseer una cola aparentemente desnuda, pero con vellosidades finas. El color puede variar mucho, desde el gris claro hasta el café o negro y combinaciones de los anteriores. Generalmente es café claro o negro en las partes superiores del cuerpo y claro o blanco ventralmente; la cola es más clara por debajo. Las formas comensales tienden a tener cola más larga y pelaje más oscuro que las formas salvajes. Los pies posteriores son en general angostos y los dedos externos tienden a ser más cortos. Las hembras tienen 10 o 12 mamas. Al igual que el resto de los roedores, posee cuatro incisivos, dos superiores y dos inferiores, carece de caninos y premolares anteriores, lo que ocasiona que haya un espacio vacío. Sus incisivos tienen una muesca y crecen durante toda su vida a partir de la base, que va sustituyendo la porción desgastada por la actividad de cortar y roer materiales duros. La parte exterior del diente es más dura y carece de nervio, salvo en la base. El hábitat natural de esta especie puede ser de tipo boscoso, sabanas y pastizales, incluso en zonas rocosas. Algunas poblaciones pueden ser totalmente dependientes de zonas habitadas por humanos o campos de cultivo (Álvarez, 2008).



Figura 18. *Mus musculus*. Vista dorsal.



Figura 19. *Mus musculus*. Vista lateral.



Figura 20. *Mus musculus*. Vista ventral.

Sorex ventralis (Merriam, 1895)

Es una pequeña musaraña, la parte posterior es de color marrón a sepia oscuro, mientras que el abdomen es un poco más claro. Las caderas tienen pelos de color marrón oscuro que se extienden 0.75 mm más allá del pelaje dorsal. Su tercer diente unicuspíde superior es más pequeño que el cuarto. El primer par de incisivos tienen un diente mediano ubicado dentro del pigmento, tienen dos dentículos, espacios interdenticulares poco

profundos, pigmento en una sección y una tira larga de pigmento en el borde anteromedial. El tamaño del cráneo tiene una longitud de menos de 17.4 mm. Esta especie habita bosques maduros de robles, pinos y abetos. Se puede encontrar desde los 2,760 msnm hasta los 3,000 msnm (Ceballos, 2014).



Figura 21. *Sorex ventralis*. Vista dorsal.



Figura 22. *Sorex ventralis*. Vista lateral.



Figura 23. *Sorex ventralis*. Ventral.

Myotis velifer (J. A. Allen, 1890)

Esta especie es la más grande de entre todas las especies mexicanas de este género. Las hembras tienen antebrazos significativamente más grandes y series de dientes maxilares. El antebrazo de esta especie es el más largo del género en América del Norte y varía de 35 mm a 46 mm. La coloración dorsal varía de marrón claro o sepia a marrón oscuro, la región ventral es un color cremoso. Su pelo es largo, ligeramente sedoso y bicolor. Las orejas tienen un lóbulo en la base del borde interno y se extiende más allá de la punta de la nariz. El trago es delgado con el borde anterior casi recto y el extremo distal termina en punta roma; su longitud es cercana a la mitad de la longitud de la oreja. La membrana interfemorales rodea la cola, no sobresale más allá del borde posterior. Las patas son robustas y grandes. En los murciélagos adultos, la cresta sagital se encuentra bien desarrollada. Los molares son robustos, su ancho en comparación con el palatino es mayor que en cualquier otro miembro del género *Myotis*. Habita una gran variedad de tipos de vegetación, incluyendo bosques lluviosos caducifolios, bosques lluviosos espinosos, matorrales xerófilos, bosques de roble, bosques de pino, bosques templados y áreas alteradas. Se ha encontrado desde el nivel del mar hasta 3,000 msnm (Ceballos, 2014).



Figura 24. *Myotis velifer*. Vista dorsal.



Figura 25. *Myotis velifer*. Vista ventral.