



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE *Ehrlichia canis* EN
HUMANOS, PERROS Y GARRAPATAS DE SINALOA, MÉXICO**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

CAROLINA GUADALUPE SOSA GUTIÉRREZ

TUTOR

MARÍA TERESA QUINTERO MARTÍNEZ

COMITÉ TUTORAL

**MARÍA GUADALUPE GORDILLO PÉREZ
ALFREDO SAHAGÚN RUÍZ**

MÉXICO D. F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dedicatorias y agradecimientos

A mis padres

Por el apoyo brindado y la comprensión recibida incondicionalmente en este tiempo en el cual he buscado mi camino profesional y personal.

A mis hermanos

Que sin una pizca de idea de lo que estoy haciendo acá continúan apoyándome y alentándome a seguir.

A mi pareja y amigas

Por soportar, emocionarse y entristecerse cada vez que corría el gel.

A mis maestros

Que con el paso del tiempo dejaron atrás el título de Doctor(a), para ser grandes amigos(as), en especial a la Dra. Guadalupe Gordillo y la Dra. Teresa Quintero con mucho cariño y respeto, las cuales me guiaron para aterrizar tantas ideas en esta investigación.

A la UNAM

Es un privilegio haber estado en esta maravillosa Institución.

A todas las personas que contribuyeron con poco o mucho en mi formación tanto personal como profesional.

A la bacteria que me causó curiosidad y lo sigue haciendo.

A un par de cuadrúpedos peludos y cariñosos que provocaron mi interés en esta fabulosa enfermedad.

Este proyecto fue financiado por:
CONACYT 87 868 SALUD 2008-1

Alumna becada por CONACYT, No. 252266
Alumna becada por Formación de Investigadores IMSS, No. 2010094.

ÍNDICE GENERAL

<i>Capítulo</i>	<i>Página</i>
DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE GENERAL	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADRO	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
2.1 Generalidades de la ehrlichiosis canina	3
2.2 Epidemiología mundial de ehrlichiosis	4
2.2.1 Epidemiología de ehrlichiosis canina en México	4
2.3 Taxonomía	5
2.3.1 Características morfológicas <i>E. canis</i>	6
2.3.2 Genoma de <i>E. canis</i>	6
2.4 Mecanismos de transmisión	7
2.5 Distribución de la Familia Ixodidae	7
2.5.1 Importancia Médica y Veterinaria	7
2.6 Morfología de <i>R. sanguineus</i>	9
2.6.1 Ciclo de vida de <i>R. sanguineus</i>	10
2.7 Patogénesis	10
2.8 Presentación clínica	12
2.8.1 Fase aguda	13
2.8.2 Fase subclínica	13
2.8.3 Fase crónica	14
2.9 Manifestaciones clínicas de ehrlichiosis en humanos	14
2.10 Métodos de Diagnóstico	15
2.10.1 Técnica de frotis sanguíneo	16
2.10.2 Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFA)	16
2.10.3 Cultivo celular	17
2.10.4 Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	17
2.10.5 Secuenciación	18
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	21
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 Diseño del Estudio	22
6.2 Universo de Estudio	22

6.3 Tamaño de la muestra	22
6.3.1 Tamaño de muestra en humanos	22
6.3.2 Tamaño de muestra de perros	22
6.3.3 Tamaño de muestra de garrapatas	23
6.4 Definición de Caso con Sospecha por el CDC	23
6.4.1 Criterios de Inclusión	23
6.4.2 Criterios de Eliminación	23
6.5 Obtención y procesamiento de las muestras	23
6.5.1 Extracción de las garrapatas sobre el hospedero	24
6.5.2 Disección de las garrapatas	24
6.5.3 Extracción de DNA de muestras de sangre de perros y humanos	24
6.5.4 Amplificación del PCR	25
6.5.5 Purificación de los productos de PCR	26
6.5.6 Secuenciación	26
6.6 Análisis Estadístico	26
VII. RESULTADOS	27
7.1 Detección de los genes <i>gp36-L</i> y <i>16S rRNA</i> en DNA de perros	28
7.1.1 Manifestaciones clínicas de los perros PCR positivos	29
7.2 Detección de los genes <i>gp36-L</i> y <i>16S rRNA</i> en DNA de humanos	29
7.2.1 Manifestaciones clínicas de los humanos PCR positivos	30
7.3 Detección de los genes <i>gp36-L</i> y <i>16S rRNA</i> en DNA de garrapatas	30
7.4 Evaluación de la transmisibilidad de la infección entre perros, garrapatas y humanos	32
7.5 Análisis de la reacción de secuenciación	33
VIII. DISCUSIÓN	36
IX. CONCLUSIONES	40
X. LITERATURA CITADA	41
IX. ANEXOS	48
Anexo 1. Formato para clínicas veterinarias	48
Anexo 2. Preparación del Buffy coat	49
Anexo 3. Extracción de DNA en Buffy coat	49
Anexo 4. Extracción de DNA en garrapatas	50
Anexo 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1%	51
Anexo 6. Extracción de producto de PCR en gel	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Árbol filogenético de la Familia <i>Anaplasmataceae</i> basado en la secuencia del gene <i>16S rRNA</i>	6
2	Patogénesis de <i>Ehrlichia canis</i>	11
3	Electroferograma productos de PCR en gradiente para determinar la mejor temperatura de alineamiento del gene <i>gp36-L</i> .	27
4	Electroferograma de PCR en gradiente para determinar la mejor temperatura de alineamiento del gene <i>16Sr RNA</i> .	28
5	Electroferograma del producto PCR positivo para el gene <i>16S rRNA</i> y determinar la especie en perros.	28
6	Electroferograma del producto de PCR positivo para el gene <i>gp36-L</i> y determinar género en humanos.	29
7	Electroferograma del producto de PCR positivo para el gene <i>16S rRNA</i> y determinar especie en humanos.	30
8	Electroferograma del producto PCR positivos para el gene <i>16S rRNA</i> de garrapatas.	31
9	Electroferograma de productos PCR positivos al gene <i>16S rRNA</i> y determinar <i>Ehrlichia canis</i> en humano, perros y garrapatas.	32
10	Electroferograma de productos de PCR positivos de humano, perro y garrapata para la secuenciación del gene <i>16S rRNA</i> para extracción y posterior secuenciación	33
11	Electroferograma de productos de PCR purificados de humano, perro y garrapata para la secuenciación del gene <i>16S rRNA</i>	34
12	Fragmento de la secuencia de DNA amplificado en perro de la región 28598 a 28672 del gene <i>16S rRNA</i>	34
13	Alineamiento de las secuencias de perro, humano y garrapata contra la cepa de referencia a <i>Ehrlichia canis</i> .	35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Distribución de las diferentes especies de <i>Ehrlichia</i> , enfermedades que transmiten, vectores, hospederos susceptibles y células afectadas.	9
2	Antecedentes de sensibilidad y especificidad de diferentes técnicas diagnósticas utilizadas para <i>Ehrlichia canis</i> .	15
3	Iniciadores utilizados con diferentes genes y muestras de tejidos y sangre para <i>Ehrlichia canis</i>	17
4	Secuencias de los iniciadores utilizados para amplificar a los genes específicos de <i>Ehrlichia</i> spp. y <i>Ehrlichia canis</i>	25
5	Resultados generales de los productos PCR positivos de perros, humanos y garrapatas para los genes <i>gp36-L</i> y <i>16S rRNA</i>	27
6	Manifestaciones clínicas presentadas y valore de significancia de perros con ehrlichiosis monocítica.	29
7	Manifestaciones clínicas presentadas en humanos con ehrlichiosis y su valor de significancia	30
8	Identificación, estadios y resultados a los genes <i>gp36-L</i> y <i>16S rRNA</i> de las garrapatas colectadas.	31

ABREVIATURAS

Cultivo celular (CC)
Centro para el control y prevención de enfermedades (CDC)
Ehrlichiosis monocítica canina (CME)
Ácido desoxirribonucleico (DNA)
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
Ehrlichiosis granulocítica humana (EGH)
Ehrlichia canis (*E. canis*)
Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)
Ehrlichiosis monocítica humana (HME)
Intervalo de confianza (IC)
Inmunofluorescencia de anticuerpos (IFA)
Inmunofluorescencia indirecta (IFI)
Inmunoglobulina G (IgG)
Inmunoglobulina M (IgM)
Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)
Neorickettsia sennetsu (*N. sennetsu*)
Pares de bases (pb)
PBS
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
Rickettsia rickettsi (*R. rickettsi*)
Tris base-ácido acético-EDTA (TAE)
Tris-borato- con EDTA (TBE)
Ultravioleta (U.V)
Virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH)

RESUMEN

Introducción. La ehrlichiosis monocítica canina, es una enfermedad infecciosa emergente que afecta a humanos y perros, cuyo agente etiológico es *Ehrlichia chaffeensis*, *E. ewingii* y *E. canis*. Los cuales son transmitidos a través de la mordedura de las garrapatas Ixodes. En México, la seroprevalencia de *E. canis* en perros es de 49.3% con mayores cifras en los estados del Noroeste del país como Sinaloa, Baja California y Sonora. *E. chaffeensis* tiene una homología genética con *E. canis* de 96% y con *E. ewingii* de 94%. Las tres especies son patógenas para el humano reportándose el primer caso de *E. canis* en Venezuela.

Objetivos. Diferenciar mediante biología molecular *Ehrlichia canis* en humanos, perros y garrapatas; para así confirmar la presencia de esta enfermedad posiblemente emergente y zoonótica en Sinaloa.

Metodología. Se realizó la extracción de DNA con un kit comercial de Qiagen® a partir de sangre de perros y humanos dueños y trabajadores, así como de garrapata para la búsqueda de los genes *gp36-L* y *16S rRNA* de *Ehrlichia* spp. y *Ehrlichia canis* se realizó PCR. Los productos amplificados se purificaron con el kit gel Extration de Qiagen® para la secuenciación y con esos resultados se hizo la búsqueda de secuencias homólogas.

Resultados. De 149 perros 41 fueron positivos al gene *gp36-L* y 25 para el gene *16S rRNA*. De 139 grupos de garrapatas; *R. sanguineus*, *D. variabilis*, *H. leporis-palustris* e *I. scapularis* y *Boophilus* spp. estudiados; 32 fueron positivas para el gene *gp36-L* y 29 *16S rRNA*. En 110 DNA de humanos, 22 fueron positivas a *gp36-L* y 12 positivas a *16S rRNA*. Las manifestaciones clínicas presentadas tanto en humanos como perros fueron: fiebre, cefalea, mialgia, nauseas y vómito. Se encontró una homología de 85% (662/770) entre la cepa Jake de referencia y la secuencia de perro amplificada con un 2%(16/770) de mutaciones puntuales.

Conclusiones. Este es el primer reporte en el país en confirmar una zona endémica de ehrlichiosis monocítica. Se demuestra la transmisibilidad de esta enfermedad del perro al humano a través de la mordedura de la garrapata. Las instituciones de salud, médicos y veterinarios deben integrar ésta enfermedad emergente en el diagnóstico diferencial junto con otras enfermedades hemorrágicas de perros y humanos.

Palabras clave. *Ehrlichia canis*, zoonosis, perros, garrapatas, humanos.

ABSTRACT

Introduction Canine monocytic ehrlichiosis, is an infectious emergent disease that affects humans and dogs. The etiologic agents are *Ehrlichia chaffeensis*, *E. ewingii* and *E. canis*. Which are transmitted across the bite of the ticks *Ixodes*. In Mexico, the *E. canis* seroprevalence of dogs is 49.3% with high seroprevalence in the Northwest states of the country (Sinaloa, Baja California and Sonora). Three species are pathogenic for the human the first case brought of *E. canis* in Venezuela.

Aims: Characterization of *Ehrlichia canis* in dogs, ticks and human to confirm the presence of this zoonotic emergent disease in Sinaloa.

Material and Methods: DNA was extracted from blood of dogs, owners, veterinaries and ticks samples with QIAGEN commercial kit. PCR for the genes *gp36-L* and *16S rRNA* of *Ehrlichia spp.* The amplified products were sequenced and aligned with the Jake strain sequence of the Blast program.

Results In 41/149 (27.5%) DNA's dogs were positive by the gene *gp36-L* and 25/149 (17.9%) for the *16S rRNA* gene. In 29/139 (20.8%) ticks were positive by the *16S rRNA* gene; The positive ticks were *R. sanguineus*, *D. variabilis*, *H. leporis-palustris*, *I. scapularis* and *Boophyllus spp.*;In 22/110 (20%) humans DNA's were positive to the genes *gp36-L* and 16/110 (16.4%) to *16S rRNA*. The clinical manifestations were fever, headache, myalgia, nausea and vomiting similar. The seven sequences of dogs shows 85 % homology with 16 punctual mutation and 2% deletion with the reference.

Conclusions Is the first report in the country that confirm an endemic zone of Monocytic Ehrlichiosis. We are demonstrating the transferability of this disease of the dog to the human by the bite of the tick. The institutions of health, doctors and veterinarians must integrate this emergent disease in the differential diagnosis with other hemorrhagic diseases of dogs and humans.

Keys words. *Ehrlichia canis*, zoonotic, humans, dogs, tick.

I. INTRODUCCIÓN

La ehrlichiosis monocítica canina (CME), es una enfermedad emergente de distribución mundial, cuyo agente etiológico es la bacteria *Ehrlichia canis*, y transmitida por la mordedura de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Birchard y Sherding, 1996). La distribución de la ehrlichiosis canina está relacionada con la distribución del vector. Se ha reportado su presencia en cuatro continentes incluyendo Asia, África, Europa y América (Waner y Harrus, 2004), la cual prolifera en regiones tropicales y subtropicales (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005).

La seroprevalencia de *E. canis* en perros es variable en el continente Americano, en Estados Unidos de América es de 0.6% (Bowman *et al.*, 2009) mientras que en México es de 49.3% (Núñez, 2003).

En los últimos 50 años han sido descritas nuevas especies de Rickettsias patógenas para el humano. En 1955 se describió la primera especie de *Ehrlichia* (actualmente *Neorickettsia sennetsu*) que produce enfermedad en humanos (López *et al.*, 2003). Desde entonces diferentes especies de *Ehrlichia* han sido reportadas en reservorios y garrapatas, de las cuales *Ehrlichia chaffeensis*, *E. ewiingii*, *N. sennetsu*, *Rickettsia rickettsii* y *Anaplasma phagocitophilum* son de mayor importancia patógenas para el hombre (Waner y Harrus, 2004).

Actualmente *E. chaffeensis*, agente causal de *Ehrlichiosis Monocítica Humana (HME)* (Pérez *et al.*, 2006) es la más reportada en Estados Unidos de Norteamérica con 471 casos en 2005 (Dumler *et al.*, 2007). Se transmite por las garrapatas *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis* e *Ixodes scapularis*, las cuales también transmiten otras enfermedades emergentes como la enfermedad de Lyme (Góngora *et al.*, 1999; Gordillo *et al.*, 2009).

Ehrlichia chaffeensis causa al humano las mismas manifestaciones clínicas que *E. canis* en los perros; ambas especies están estrechamente relacionadas, reportándose el primer caso de ehrlichiosis humana por *E. canis* en Venezuela en un paciente asintomático y posteriormente en un paciente con manifestaciones clínicas (Unver *et al.*, 2001, Stich *et al.*, 2002 y Pérez *et al.*,

2006). La ehrlichiosis canina tiene tres fases (aguda, subclínica y crónica) y las manifestaciones clínicas varían desde leves a graves con una letalidad del 46% en su fase crónica (Gal *et al.*, 2008).

El diagnóstico de *E. canis*, se basa en la visualización de la mórula en los monocitos circulantes, detección del aumento de anticuerpos en suero mediante inmunofluorescencia indirecta, Western Blot o la demostración del DNA bacteriano mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), aunque las técnicas de biología molecular han mostrado ser más específicas que las pruebas serológicas (Waner y Harrus, 2004).

Ehrlichia canis se ha reconocido como una especie potencialmente zoonótica que se transmite por la mordedura de la garrapata *R. sanguineus*. El hospedero natural de éste vector es el perro. Se tiene que considerar el papel de los perros como probables centinelas de la enfermedad; es importante conocer si la mascota contagiada puede favorecer la infección de su propietario en cualquiera de las tres fases de la enfermedad y convertirse así, en un serio problema de salud pública y veterinaria.

El objetivo de este trabajo fue el de diferenciar mediante biología molecular *E. canis* en humanos, perros y garrapatas, mediante las técnicas de PCR y secuenciación de los genes *gp36-L* y *16S rRNA* para determinar género y especie respectivamente.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de la ehrlichiosis canina

La ehrlichiosis canina es una enfermedad ampliamente distribuida, se ha reportado en los Estados Unidos de Norteamérica, países Africanos del Norte y Sur, Europa (McBride *et al.*, 1996) y México (Núñez, 2000). Es también llamada “Enfermedad del perro rastreador”, “Pancitopenia canina tropical”, “Fiebre canina hemorrágica” y “Tifus canino” (Birchard y Sherding, 1996).

Ehrlichia canis fue identificada por primera vez en 1935, en el Instituto Pasteur de Argelia por Donatien y Lestoquard, tras observar que algunos perros alojados en sus instalaciones e infestados por garrapatas desarrollaban un proceso febril agudo que cursaba con anemia. En las extensiones sanguíneas de los perros afectados, observaron unos pequeños microorganismos en el interior de los monocitos, creyendo se trataba de alguna especie de *Rickettsia*. Inicialmente el microorganismo recibió el nombre de *R. canis*. Moshkovskii sustituyó en 1945 ese nombre por el actual *E. canis*, como reconocimiento a Paul Ehrlich; biólogo alemán. A pesar de que la ehrlichiosis era conocida desde la década de los 30's, los investigadores intensificaron su atención tras la aparición de brotes epizooticos en perros de las fuerzas armadas norteamericanas (Goddard, 2000).

En Japón fue descubierto el primer agente ehrlichial en humanos por Misao y Kobayashi en 1955. El síndrome producido por este agente fue llamado fiebre de Sennetsu (*Neorickettsia sennetsu*), semejante a la mononucleosis. Esta especie se encuentra filogenéticamente relacionada con *N. risticii*, causante de la fiebre equina del Potomac y algunas infecciones en perros (López *et al.*, 2003).

En 1986 la ehrlichiosis humana fue diagnosticada por primera vez fuera de Asia, en los Estados Unidos de Norteamérica la cual era una enfermedad desconocida producida por un organismo íntimamente relacionado con *E. canis*. En 1990, con motivo de prácticas militares que realizaban en Fuerte Chaffee, Arkansas donde quince miembros de la Guardia Nacional del Estado de Iowa presentaron síntomas parecidos a una rickettsiosis humana transmitida

por garrapatas, denominada fiebre manchada de las montañas rocosas. Los síntomas más frecuentes fueron: fiebre, cefalea, mareos, náuseas y en algunos casos erupciones cutáneas. Los organismos causantes fueron aislados e identificados como una nueva especie de *Ehrlichia*, a la que se denominó *E. chaffeensis* (Dawson *et al.*, 1991).

El primer caso de ehrlichiosis humana en México se reportó en 1999, en Mérida, Yucatán; en el cual se identificaron anticuerpos contra *E. chaffeensis* mediante Inmunofluorescencia indirecta (Góngora *et al.*, 1999).

2.2 Epidemiología mundial de ehrlichiosis

Los Estados Unidos de América ha reportado dos especies zoonóticas: *E. chaffeensis* y *E. ewingii*, en el cual varios estudios muestran semejanzas entre las manifestaciones clínicas producidas por varias especies de *Ehrlichia* como son: fiebre, trombocitopenia, depresión y anorexia, así como el reporte del primer caso en humano causado por *E. canis* en Venezuela que sugieren a estas dos especies son organismos muy próximos a la especie de *Ehrlichia* que infecta a los cánidos (Perez *et al.*, 2006).

Estudios seroepidemiológicos realizados en diferentes partes del mundo muestran una prevalencia alta a *E. canis*. En Estados Unidos de América; Bowman y *et al.*, (2009) reportaron una seroprevalencia nacional de anticuerpos contra *E. canis* del 0.6% con un tamaño de muestra de 982 mil perros; observando la mayor prevalencia en el sureste (1.3%) y el resto semejante a la media en el noreste (0.3%), medio oeste (0.4%) y oeste (0.6%). En América latina, países como Cuba han presentado una seroprevalencia de 82.5% (León *et al.*, 2008); Chile de 35% (López *et al.*, 2003); Brasil 23% (Trapp *et al.*, 2006). Otros países en los cuales se ha reportado la seroprevalencia de *E. canis*, son Tailandia con 71% (Suksawat *et al.*, 2001); Senegal 53% (Parzy *et al.*, 1991), Túnez 49% (Ghorbel *et al.*, 1994) y Suiza 2.2% (Pusterla *et al.*, 1998).

2.2.1 Epidemiología de ehrlichiosis canina en México

En México se reporta el primer caso de ehrlichiosis canina por García en 1996. En el 2000, la encuesta nacional seroepidemiológica en perros reportó

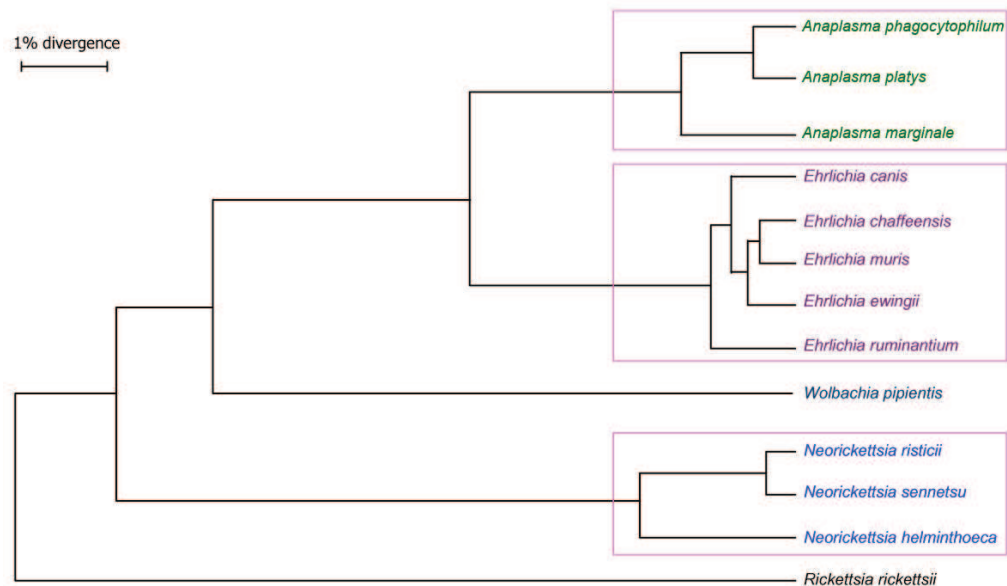
una seroprevalencia de 33.1% mediante la prueba de ELISA, los estados del Noroeste del país como: Baja California (70.2%), Sonora (61.5%), Tamaulipas (49.7%), Baja California Sur (49.1%) y Sinaloa con 48.3% presentaron los más altos niveles de anticuerpos (Núñez, 2000). En dos estudios posteriores en Mérida, Yucatán se reportó una seroprevalencia de 44% por medio de ELISA (Rodríguez–Vivas *et al.*, 2005) y 8.7% mediante Inmunofluorescencia indirecta (Jiménez *et al.*, 2008), respectivamente. En la zona noroeste del país durante el 2007 se reportaron 2 estudios serológicos, el primero en Mexicali, Baja California con una seroprevalencia de 49.3% (Tinoco *et al.*, 2007) y el segundo en Sinaloa con 74.5% (Sosa, 2007); mostrando una seroprevalencia más alta en ambos casos que la reportada 7 años atrás por Núñez.

2.3 Taxonomía

La clasificación taxonómica de este microorganismo ha experimentado variaciones a medida que se profundiza en su estudio. En la nomenclatura anterior, la tribu se clasificaba dentro de la familia Rickettsiaceae del orden Rickettsiales (CDC, 2000). Los recientes estudios genéticos y moleculares sobre la secuenciación del gene *16S rRNA*, ha sugerido la reorganización (Figura 1) dentro del orden Rickettsiales. Se propuso la sustitución de la tribu Ehrlichieae por la familia Anaplasmataceae y la reorganización de las ya existentes, resultando 4 géneros: *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Wolbachia* y *Ehrlichia*. El género *Cowdria*, con su única especie *Cowdria ruminantium* cambia para ser denominada *E. ruminantium* (Dumler *et al.*, 2001).

El género *Anaplasma* reagrupa de un modo subjetivo las especies *E. phagocytophilum*, *E. equi* y el agente causante de la *Ehrlichiosis Granulocítica Humana (EGH)* en una sola especie *Anaplasma phagocithophilum*. *E. platys* como *A. platys*. *Neorickettsia* aumenta en número, incluyendo a las especies *E. sennetsu* y *E. risticii* reconociéndose como: *N. sennetsu* y *N. risticii*, respectivamente. En el género *Ehrlichia*, quedan las especies *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ewingii* y *E. ruminantium*. *Wolbachia* tiene una sola especie; *W. pipientis* (Dumler *et al.*, 2001).

Figura 1. Árbol filogenético de la Familia *Anaplasmataceae* basado en la secuencia del gene *16S rRNA* (CDC, 2009).



2.3.1 Características morfológicas de *E. canis*

Ehrlichia canis es una α -proteobacteria, Gram negativa de forma cocoide. Dentro de su ciclo se pueden distinguir diferentes formas como cuerpos elementales, que tienen un diámetro de 0.50 a 0.90 μm y se divide por fisión binaria para dar lugar a los cuerpos iniciales de 1.5 a 2.5 μm , que a su vez se dividen produciendo las típicas “mórulas” formadas por más de 40 cuerpos elementales que pueden llegar a tener un tamaño de 4 a 5 μm . La forma de “mórula” es una característica definida de este grupo de bacterias patógenas. (Sainz *et al.*, 2003).

2.3.2 Genoma de *E. canis*

La secuencia genómica completa de *E. canis* ha sido publicada y consiste; en un cromosoma circular de 1, 315,030pb que codifican un total de 984 genes de los cuales incluyen: 925 proteínas, 40 especies de RNA estables, además de 17 pseudogenes y una proporción de secuencias no codificantes (27% genes). Algunos genes asociados con la interacción hospedero - patógeno han sido identificados, incluyendo un pequeño grupo de proteínas (n =12) con

repeticiones en tándem y otro grupo de proteínas codificantes con dominios homólogos a la anquirina eucariota ($n = 7$). Los genes *5S* y *23S rRNA* forman un operón, mientras que el gen *16S rRNA* está separado por ± 0.8 mb. Esta característica no es común en un genoma bacteriano, el cual tiene uno o múltiples copias de operones rRNAs en *16S*, *23S* y *5S* (Mavromatis *et al.*, 2006). El gen *16S rRNA*, es una zona altamente conservada de 14 kb, Siarkou *et al.*, en el 2007 reportan que las secuencias de cepas encontradas en Grecia tenían una homología del 100% con las cepas encontradas en América (Venezuela y Brasil), así como Europa (Grecia), y Asia (Tailandia y Turquía).

2.4 Mecanismo de Transmisión

Ehrlichia canis es transmitida por un vector artrópodo de la clase Arachnida de la subclase Acari del orden Ixodida de la familia Ixodida, género *Rhipicephalus* y especie *sanguineus*. Esta garrapata tiene tres estadios de maduración (larva, ninfa y adulto macho o hembra) de los cuales solo el estado adulto transmite la bacteria. *E. canis* se disemina desde el intestino de la garrapata y pasa a las glándulas salivales y esta al alimentarse inyecta las secreciones contaminadas al hospedero por vía mecánica. Una segunda vía de transmisión es la transfusión sanguínea (Waner y Harrus, 2004).

2.5 Distribución de la Familia Ixodidae

Las garrapatas de la familia Ixodidae se distribuyen en todo el mundo, incluyendo las zonas antárticas, pero encontradas fácilmente en las regiones tropicales y subtropicales. Son parásitos obligados preferentemente de vertebrados, siendo vulnerables los mamíferos, quienes por su temperatura, olor y fuente de nutrientes son altamente atractivos para estos (Schmidt y Roberts, 1981). Sin embargo, también son susceptibles de ser parasitadas aves, reptiles y anfibios.

2.5.1 Importancia Médica y Veterinaria

La principal importancia de las garrapatas se debe a que actúan como reservorios y vectores de organismos patógenos, los cuales son transmitidos a los vertebrados durante la alimentación o indirectamente por contacto con los

fluidos de las glándulas coxales y heces (Vázquez, 1987). Las “garrapatas duras” o Ixodidae actúan como vectores o transmisores de una amplia gama de agentes patógenos para sus hospederos, como son: virus (encefalitis), rickettsias (fiebre Q, fiebre de las montañas rocosas, ehrlichiosis o anaplasmosis), bacterias (tularemia), espiroquetas (enfermedad de Lyme), protozoarios (piroplasmosis canina), etc. La relación que existe en cada especie con la ehrlichiosis, se compara si las garrapatas identificadas se han reportado como vectores potenciales o como vectores competentes (si se han encontrado formando parte de un ciclo enzoótico naturalmente) así como si sus huéspedes han sido reportados como reservorios potenciales o competentes.

La “garrapata tropical del ganado” o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini 1887), está ampliamente distribuida por todo el mundo, incluyendo México; en donde Durango, Chihuahua y Sonora no han reportado su presencia (Hoffmann y López-Campos, 2000). Parasita al ganado equino y bovino, aunque también se le encuentra en perros, ovejas y raramente en el hombre y animales salvajes. Es un vector de *B. bigemina*, *B. ovis*, *A. marginale* y *Theileria equi* (Guerrero *et al.*, 1986).

La llamada “garrapata canina americana” o *D. variabilis* (Say 1821) se encuentra en el este de las montañas Rocosas, así como en la costa del Pacífico. En México se ha reportado en Chiapas, Hidalgo, Edo. de México, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Yucatán. El hospedero predilecto para los adultos es el perro, pero se alimenta indistintamente de grandes mamíferos (Hoogstraal, 1972; Hoffmann y López-Campos, 2000). Parasitan con frecuencia a humanos que realizan actividades al aire libre. Recientemente se demostró de manera experimental que la garrapata *D. variabilis*, en estado de ninfa es capaz de transmitir *E. canis* (Bowman *et al.*, 2009).

En las regiones faunísticas neártica y neotropical *Haemaphysalis leporispalustris* (Packard 1869) es un parásito de conejos tanto silvestres como domésticos. Es el principal reservorio de la tularemia en Alaska (Hopla *et al.*, 1994). Se tienen datos de distribución que hacen suponer que se encuentra prácticamente por todo el país (Hoffmann y López-Campos, 2000).

Ixodes scapularis (Say, 1821) la reportan para los Estados de Tamaulipas, Jalisco Coahuila y Oaxaca (Hoffman y López-Campos, 2000, Guzmán *et al.*, 2007 y Gordillo *et al.*, 2009) sobre perros, ganado y *Felis pardalis*. Es el principal vector de *Borrelia burgdorferi* agente etiológico de la Enfermedad de Lyme (Gordillo *et al.*, 2009).

En el cuadro 1, se muestra la distribución geográfica de las diferentes especies de *Ehrlichia*, enfermedades que transmiten, hospederos y vectores así como las células que afectan.

Cuadro 1. Distribución de las diferentes especies de *Ehrlichia*, enfermedades que transmiten, vectores, hospederos susceptibles y células afectadas.

Especie (Enfermedades)	Distribución geográfica	Vector	Leucocitos infectados	Huésped
Monocítica				
<i>E. canis</i> (Ehrlichiosis Monocítica canina)	Mundial, tropical y templado.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Monocitos	Cánidos
<i>E. chaffensis</i> (Ehrlichiosis monocítica humana)	EUA	<i>Amblyomma americanum</i> <i>Dermatocentor variabilis</i>	monocitos, neutrófilos y linfocitos	Humanos, perros y venados
Ehrlichiosis humana Venezolana	Venezuela	-	monocitos	Humanos
<i>N. sennetsu</i> (Fiebre sennetsu)	Occidente de Japón, Malasia	-	monocitos	Humanos
<i>N. risticii</i>	EUA, Canadá	-	monocitos	Caballos
Granulocítica	EUA	<i>A. americanum</i> <i>Otobius megnini</i>	eosinófilos, neutrófilos,	Perros y humanos.
<i>E. ewingii</i> (Ehrlichiosis granulocítica canina)				
Otros	África sub- Sahara	<i>A. hebraeum</i>	endoteliales, macrófagos, neutrófilos	Ganado
<i>E. ruminantium</i> (hidropericardio)				

- Aún se desconoce el vector.

2. 6 Morfología de *R. sanguineus*

La garrapata *R. sanguineus* es de tamaño pequeño a mediano. Ambos sexos presentan un color marrón oscuro, sin ningún tipo de ornamentación. Los palpos son cortos y el gnatosoma posee prominentes ángulos laterales que le confieren una forma hexagonal; los ojos sencillos son ligeramente convexos, los estigmas respiratorios en forma de coma; Coxa I con dos espolones grandes de tamaño similar. El macho tiene escudo que cubre por completo la

parte dorsal, con tres surcos profundos en la parte posterior, en la parte ventral tienen una placa bien desarrollada y otra accesoria, menos evidente a cada costado del ano. La hembra cuenta con un escudo dorsal que cubre hasta el primer tercio del cuerpo, más largo que ancho y se angosta en la región post-ocular. Una hembra ingurgitada pesa de 100 a 250 mg, el tamaño aproximado de una hembra en ayuno es de 1,5 a 2,0 mm de ancho y de 3,0 a 4,0 mm de largo (Guglielmone *et al.*, 2009).

2.6.1 Ciclo de vida de *R. sanguineus*

El ciclo de *R. sanguineus* incluye la interacción con tres hospederos, las mudas ocurren fuera de estos. Bajo condiciones climáticas favorables las larvas y ninfas se alimentan sobre los perros por un período de 3 a 7 días, respectivamente; en tanto que las garrapatas hembra necesitan de 7 a 12 días para completar su alimentación. Los machos pueden permanecer por más tiempo sobre el hospedero. Los sitios preferidos de fijación sobre el perro son las orejas, el cuello, dorso, cabeza y espacios interdigitales. La muda de larva a ninfa dura de 8 a 11 días de duración, la muda de ninfa a adultos requiere de 11 a 23 días. El conjunto del período de pre-ovoposición y ovoposición puede alcanzar 17 a 27 días en las cuales pueden ovopositar alrededor de 3000 a 4000 huevos. En su etapa adulta puede sobrevivir de 155 a 568 días sin alimentarse y transmitir la infección durante 155 días después de infectarse. La segunda generación de garrapatas no puede transmitir la enfermedad debido a que no hay transmisión transovárica. Las garrapatas son más abundantes durante la primavera-verano y la mayoría de los casos agudos ocurren durante este período (Guglielmone *et al.*, 2009). Es incierto lo que ocurre en la garrapata, *Ehrlichia* spp, entra a la garrapata

2.7 Patogénesis

Después de ingresar al hospedero inicia el periodo de incubación de 8 a 20 días durante el cual la bacteria adopta tres formas dentro de los leucocitos. La forma de *Ehrlichia* spp. inicialmente es esférica con un diámetro de 1.5 a 2.5 μm , la cual se multiplica a lo largo de la membrana del leucocito uniéndose una con otra formando la mórula. Las inclusiones de la mórula fuera del citoplasma

del leucocito se disocian dentro de los granulocitos. Las células infectadas típicamente contienen solo una o dos mórulas, sin embargo se han llegado a observar hasta 15 mórulas en monocitos de perros inmunodeprimidos. En la fase aguda de la infección que ocurre en las siguientes 2 a 4 semanas los organismos se multiplican en las células fagocíticas mononucleares que están circulando sin llegar a hígado, bazo y nódulos linfáticos. Las células infectadas son transportadas por la circulación sanguínea al resto del cuerpo con predilección a los pulmones, riñones y las meninges (Waner y Harrus, 2000). Entre el 70 al 80% de los casos desarrollan una bacteremia persistente y los signos clínicos pueden estar ausentes o presentarse de forma leve o grave (Waner y Harrus, 2000). Todas las etapas se caracterizan por la persistencia de trombocitopenia.

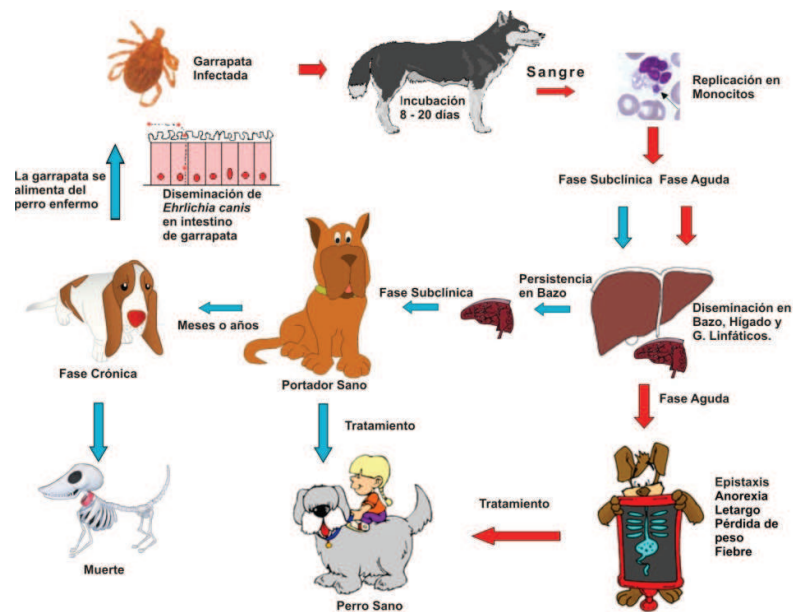


Figura 2. Patogénesis de *Ehrlichia canis* (Sosa, 2007).

El patógeno invade y prolifera en las células de endotelio de vasos pequeños, produciendo focos de destrucción. El daño vascular produce dos fenómenos:

a) Consumo, secuestro y destrucción de las plaquetas que da como resultado trombocitopenia la cual se observa durante las tres fases de la enfermedad.

b) Incremento en la permeabilidad vascular, edema, hipotensión e hipovolemia, además, las células endoteliales incrementan significativamente su nivel de superóxido (Zavala *et al.*, 2004).

El conteo de los leucocitos es variable, así como la anemia que puede desarrollarse. Después de 6 a 9 semanas los perros infectados eliminan la bacteria independientemente de la vía con la cual se infectaron, si es inmunocompetente. Los perros que no pueden montar una respuesta inmune efectiva, hacen que esta infección entre a una fase crónica en la cual se observa hasta un 46% de letalidad debido a la hemofagocitosis y estenosis micro vesicular en el hígado, hemorragias difusas que afectan al riñón, vejiga, diafragma y meninges, la invasión de la bacteria en órganos como: bazo, nódulos linfáticos, médula ósea, además de las infecciones bacterianas secundarias (Bockino *et al.*, 2003), aunque se han detectado mórulas en menor abundancia células mononucleares o peri vasculares infiltradas en cerebro, corazón, páncreas, glándulas adrenales, tracto intestinal, ovarios y tejido conectivo (Gal *et al.*, 2007).

Como muchos aspectos de la patogénesis de ehrlichiosis canina no han sido entendidos del todo, se desconoce también los mecanismos del sistema inmune que es seguido después de la infección. El sistema humoral y la inmunidad celular mediada no han sido establecidos pero ambos parecen jugar un papel importante contra la defensa del patógeno. Debido a que ehrlichia es un patógeno intracelular, es de intuir que la inmunidad celular es un claro componente para el éxito de esta bacteria. Este paradigma sugiere que en pacientes con alguna enfermedad inmunocomprometida cause la forma fatal de la enfermedad, mientras que en perros en el proceso de recuperación se observe una linfoproliferación marcada. (Paddock y Childs, 2003).

2.8 Presentación clínica

La ehrlichiosis canina puede presentarse con una amplia variedad de manifestaciones clínicas sin predilección de sexo, edad ni raza y se manifiesta clínicamente en tres fases; aguda, subclínica y crónica (Vinasco *et al.*, 2007).

2.8.1 Fase aguda

Es común encontrar garrapatas en el perro. Los signos varían de leves y no específicos, hasta comprometer la vida. Después del período de incubación (8 a 20 días), los perros entran en la fase aguda con duración de dos a cuatro semanas. Presentan manifestaciones clínicas inespecíficas como: depresión, letargia, anorexia, fiebre, linfadenomegalia, esplenomegalia, pérdida de peso, náuseas, vómito, disnea y claudicación. Pueden presentar tendencia al sangrado como: petequias y equimosis en la piel o membranas mucosas, y ocasionalmente epistaxis (McBride *et al.*, 2007).

Existen manifestaciones oculares, aunque estas no son muy frecuentes e incluyen uveítis anterior y opacidad corneal con depósitos de precipitados celulares; hipema, tortuosidad de vasos retíneales y lesiones focales. Puede haber desprendimiento de retina y ceguera debido a hemorragias subretíneales (Waner y Harrus, 2004). Pueden presentar manifestaciones neurológicas debidas a la meningitis por inflamación, hemorragias o ambas, lesiones endoteliales o trombosis; ocurre disfunción neurológica con daño del tejido nervioso central o periférico adyacente, se han observado convulsiones, estupor, ataxia con disfunción aguda central o periférica, disfunción cerebelosa, temblor de intención e hiperestesia generalizada o localizada.

En ocasiones, los pacientes pueden presentar cojera con marcha rígida secundaria a poliartropatía, que puede ocurrir por hemartrosis o depósito de complejos inmunitarios con artritis e infiltración leucocitaria en la articulación. La fase aguda suele resolverse en forma espontánea o iniciar la fase subclínica de 7 a 12 semanas, e incluso años después de cuando esta se dió de manera natural (Neer, 2000).

2.8.2 Fase subclínica

Durante este período se normaliza el peso y se resuelve la pirexia; desde el punto de vista clínico el paciente parece normal (Neer, 2000), solo se presenta trombocitopenia moderada (Rikihisa, 1991; Bulla *et al.*, 2003), leucopenia, anemia variable y persistente (Iqbal *et al.*, 1994). Si los pacientes infectados son inmunocompetentes eliminarán la bacteria; de no ser así, se presenta la fase crónica de la enfermedad.

2.8.3 Fase crónica

Es caracterizada por deterioro de la producción medular de elementos sanguíneos que da por resultado hemorragias, epistaxis, edema periférico más visible en las extremidades posteriores, emaciación e incluso llegar al choque hipovolémico causando la muerte. Los hallazgos hematológicos característicos son: trombocitopenia severa, leucopenia e hipergamaglobulinemia. Los perros pueden estar en la fase crónica de la enfermedad y mostrar signos clínicos hasta 5 años después. Los cánidos salvajes y domésticos han sido considerados como reservorio de la enfermedad; presentando una tasa de letalidad del 46% (Rikihisa, 1991).

La gravedad de la enfermedad puede estar afectada por los siguientes factores:

- 1) Infecciones concomitantes transmitidas por la misma garrapata (Waner y Harrus, 2004) como babesiosis causada por *Babesia canis* (Sosa et al., 2009) y *Babesia vogeli*, en un 14.2% (Trapp et al., 2006); anaplasmosis causada por *Anaplasma* spp 4.3% (Georges et al., 2008) en Estados Unidos de América o enfermedad de Lyme producida por *B. burgdorferi*, 6.7% (Bowman et al., 2009).
- 2) Estado inmunitario del perro que permite la concurrencia de otras infecciones adicionales (Sainz et al., 2003).

2.9 Manifestaciones clínicas de ehrlichiosis en humanos

Las manifestaciones clínicas de ehrlichiosis monocítica humana aparecen dos semanas después de la mordedura de la garrapata. Se caracteriza por fiebre, mialgia, cefalea, agotamiento o malestar general, dolor de espalda, exantema, escalofríos, náuseas, vómito, diarrea, tos y dolor abdominal. Un gran porcentaje de pacientes presentan leucopenia o trombocitopenia y algunos, anemia. Las transaminasas hepáticas (aspartato, aminotransferasas y alanina aminotransferasas), lactato deshidrogenasa y proteína C reactiva a menudo se encuentran elevadas (Adrianzen et al., 2003).

Existen condiciones que pueden hacer más susceptible al hospedero como: edad, estado nutricional, una variedad de trastornos relacionados con

enfermedades inductoras de inmunodeficiencia como cáncer y otras enfermedades infecciosas como puede ser VIH, alteraciones metabólicas, trastornos laborales, psíquicos o de estrés, que ocasionan un déficit secundario de la inmunocompetencia, además de enfermedades infecciosas oportunistas (neumonía micótica), que pueden llevar a la muerte al paciente (Tami y Tami-Maury, 2004; Oteo y Brouqui, 2005).

2.10 Métodos de Diagnóstico

Varias técnicas han sido utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad, las más frecuente son la visualización directa de la mórula en frotis y evaluaciones serológicas en conjunto con los signos clínicos (Vinasco *et al.*, 2007 y Sosa, 2007), así como los hallazgos hematológicos y bioquímicos (McBride *et al.*, 1996). La utilización de técnicas serológicas ha sido una herramienta básica en el diagnóstico, aunque solo describe la presencia de un agente etiológico, entre los géneros *Anaplasma/Ehrlichia*, y las reacciones cruzadas entre las diferentes especies de *Ehrlichia* como: *E. ewingii*, *E. muri* o *E. chaffeensis* con *E. canis* (Oteo y Brouqui, 2005; Georges *et al.*, 2008; Bowman *et al.*, 2009). Las herramientas moleculares como la PCR y secuenciación de diferentes genes como *16S rRNA* principalmente, han sido utilizadas. La primera ha probado ser un método sensible y específico para el diagnóstico, y la segunda mediante la secuenciación permite diferenciar entre las especies de *Ehrlichia* e identificar entre diferentes cepas de *E. canis* (Vinasco *et al.*, 2007). En el cuadro 2 se muestran las diferentes técnicas utilizadas con su especificidad y sensibilidad.

Cuadro 2. Antecedentes de sensibilidad y especificidad de diferentes técnicas diagnósticas utilizadas para *Ehrlichia canis*.

Material Biológico	IFA		ELISA		PCR	
	S*	E**	S*	E**	S*	E**
Sangre	90-100	95	54-73	37-79	89-100	90-100
Garrapata	80-90	70	20-30	10-15	80-100	90-100
Tejidos (hígado, bazo y médula ósea)	70-90	95	50-60	60	80-100	90-100

* Sensibilidad **Especificidad. Mod. de Bélanger *et al.*, 2002 y Agüero *et al.*, 2002.

2.10.1 Técnica de frotis sanguíneo

Se puede observar *E. canis* en los monocitos circundantes fundamentalmente, además de la médula ósea, sinusoides hepáticos y/o esplénicos, e incluso en las células del líquido cefalorraquídeo (Oteo y Brouqui, 2005) con tinción de Wright, la mórula de *Ehrlichia* spp. se presenta de una coloración azul violácea bien definida, redondeada de un extremo y ovalada del otro, los cuerpos se encuentran en forma de vacuolas en las células mononucleares (Bockino *et al.*, 2003 y Tami y Tami-Maury, 2004). El diagnóstico definitivo de ehrlichiosis se hace mediante de los cuerpos de inclusión, aunque estos solo aparecen durante la fase aguda de un 4 a 25% de los casos, por lo que son muchos los pacientes en los que no se visualizan (Sainz *et al.*, 2003 y Waner *et al.*, 2004 y Sosa, 2007). Como el número de monocitos infectados es bajo, las células examinadas deben ser mayor a 500 (Blevins *et al.*, 2008). Existen dos técnicas: frotis de sangre periférica, donde en casos de intensa bacteriemia es posible ver mórulas en los monocitos circundantes, y de capa blanca concentrada donde solo se observan células blancas sanguíneas (Tami y Tami-Maury, 2004).

2.10.2 Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFA)

El diagnóstico mediante IFA, se ha convertido en la prueba estándar de clínicas veterinarias de estados Unidos de Norteamérica y Europa para la detección de anticuerpos contra esta enfermedad.

Sus desventajas son las siguientes: a) Los anticuerpos IgM e IgG, son detectables hasta la tercera semana de la infección (McBrige *et al.*, 1996). Con esto, la interpretación de los resultados puede caer en falsos negativos o falsos positivos (McBride *et al.*, 2000). La información otorgada mediante esta técnica serológica es solo usada para sustentar la sospecha clínica, y se le denomina caso compatible (López *et al.*, 2003). b) La prueba de IFA tiene baja especificidad, con las diferentes especies de *Ehrlichia*, ya que existe reacción cruzada entre *E. canis* y diferentes especies como *E. chaffeensis*, *E. ewingii* y *A. platys* (Breitschewerdt *et al.*, 1998; McBride *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2006),

en áreas endémicas donde se puede confundir el diagnóstico y solo llegar a género (Sainz *et al.*, 2003).

2.10.3 Cultivo Celular (CCI)

Esta ha sido una técnica alternativa para el diagnóstico en sangre, es muy sensible y específica. Sin embargo, requiere entre 1 a 4 semanas para obtener los resultados, siendo una limitante para su utilización en laboratorio de cuarto nivel (McBride *et al.*, 1996).

2.10.4 Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El DNA de *E. canis* ha sido demostrado mediante PCR en muestras de sangre, medula ósea, bazo, hígado, riñones, nódulos linfáticos de perros infectados (Gal *et al.*, 2008) y en la garrapata (Stich *et al.*, 2002). Pérez y col. (2006), sugiere que la técnica de PCR es más apropiada para determinar la presencia de *E. canis* en humanos y perros que la técnica de IFA, por su mayor especificidad. La PCR para diagnóstico es de gran importancia y se han utilizado diferentes iniciadores (cuadro 3). La serología no diferencia entre una infección latente o anterior a la exposición de *Ehrlichia* spp. dada la complejidad del diagnóstico serológico, la disponibilidad de datos objetivos adicionales es recomendable. En conjunto, las manifestaciones clínicas, serológicas y evidencia molecular de *E. canis* son importantes para su diagnóstico (Vinasco *et al.*, 2007).

Cuadro 3. Iniciadores utilizados con diferentes genes y muestras de tejidos y sangre para *Ehrlichia canis*.

Autor	Nombre del gen	Secuencias	Tipo de muestra
Iqbal <i>et al.</i> , 1994	16S rRNA	A17 EC3	Sangre
McBride <i>et al.</i> , 1996	16S rRNA	EC1- EC2 y ECP1 - HE3	Sangre
Unver <i>et al.</i> , 2001	16S rRNA	A17 - 817R y 750F - EC3	Sangre y garrapatas
Warner y Dawson, 1996.	16S rRNA	15F- 842R y 537F-1442R	Sangre
Carvalho <i>et al.</i> , 2008	16S rRNA	ECC ECB HE3	Sangre
Zhang <i>et al.</i> , 2008	Gp36-L	P19F- P19R y P36F-L - P36R-L	Sangre
Gal <i>et al.</i> , 2008.	16S rRNA	ECA – HE3 y EHR16SD – EHR16SR	Tejidos

Los métodos de extracción y purificación de DNA incluyen una disrupción de las células, inactivación de RNAsas y/o DNAsas con sales caotrópicas, degradación de proteínas con proteinasa K, extracción del DNA con fenol-cloroformo y precipitación con alcoholes; etanol o isopropanol (Picazo y Ortiz, 1999).

2.10.5 Secuenciación

Este método permite conocer la secuencia exacta de los genes, la distancia entre las diferentes genopecies y subtipos para conocer la variabilidad intraespecie de las bacterias presentes en humanos, perros y garrapatas.

El gene *16S rRNA* ha sido secuenciado en su totalidad, siendo uno de los más conservados, indicando el 100% de identidad entre algunas cepas de América (Venezuela y Brasil), Europa (Grecia), y Asia (Tailandia y Turquía); por lo cual es una poderosa herramienta para la identificación y genotipificación de cepas ehrlichiales utilizadas para rastrear la evolución macromolecular de esta bacteria (Olson y Woese, 1993).

III. JUSTIFICACIÓN

Ehrlichia canis, el agente causal de ehrlichiosis monocítica canina, ha sido recientemente reconocida como una bacteria zoonótica, considerando que el perro mantiene una relación estrecha con el humano, y que el vector *R. sanguineus* pueda contagiar al humano; es importante establecer el papel del perro y la garrapata en salud pública.

El propósito de este trabajo fue establecer que la especie de *Ehrlichia* detectada en el perro y la garrapata es la misma que afecta al humano.

IV. HIPÓTESIS

Ehrlichia spp está presente en humanos, perros y garrapatas.

E. canis es el patógeno responsable de la producción de ehrlichiosis monocítica tanto en humanos como en perros de Sinaloa.

V. OBJETIVOS

GENERAL

Establecer la relación entre la ehrlichiosis monocítica canina y la humana por medio de la detección, amplificación y secuenciación de los genes *16S rRNA* y *gp36-L*.

ESPECÍFICOS

Determinar la frecuencia de ehrlichiosis en perros, garrapatas y humanos.

Determinar si *E. canis* afecta de manera simultánea a humanos, perros y garrapatas.

Determinar las manifestaciones clínicas y epidemiológicas de los pacientes positivos.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño del Estudio

Estudio Transversal Descriptivo.

El trabajo se realizó en la Unidad de Investigaciones Médicas de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del (UIMEIP) Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional (HPCMN) Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en México, Distrito Federal.

6.2 Universo de Estudio

Se consideraron a todos los perros infectados y/o con historia de infestación por garrapatas; así como a los dueños de los perros y trabajadores.

Se incluyeron perros procedentes de 13 clínicas veterinarias y dos refugios de Mazatlán (siete clínicas veterinarias y un refugio de mascotas), Culiacán (tres clínicas veterinarias, un refugio de mascotas y el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa) y Los Mochis (tres clínicas veterinarias) tomando como referencia Centro, Sur y Norte del estado de Sinaloa. Se tomaron muestras sanguíneas de los perros con sospecha de ehrlichiosis, a los dueños de las mascotas o trabajadores de clínicas y refugios que tienen contacto continuo con éstos.

6.3 Tamaño de la muestra

La estimación del tamaño de muestra, se calculó mediante el paquete Estadístico Epidemiológico (EpiStat), basándose en la población de perros, la cual fue estimada de la población humana (403 000) en 2005 por SSA Sinaloa.

6.3.1 Tamaño de muestra en humanos

En base a la población; se buscó la seroprevalencia más baja de 5% y la peor esperada de 1% (Dumler *et al.*, 2007), considerando un índice de confianza de 95% y α : 0.05. Obteniendo un tamaño de muestra de 110 humanos ($n = 110$).

6.3.2 Tamaño de muestra de perros

Se obtuvo calculando la proporción perro/humano de 1:10, el cual dio por resultado una población de 34 613 perros; se consideró un índice de confianza

de 95%, se tomó en cuenta la seroprevalencia de 8.6% (Jiménez *et al.*, 2008) y la menor esperada 2% (Bowman *et al.*, 2009), un α : 0.05, el tamaño de muestra fue de 139 perros (n = 139 perros).

6.3.3 Tamaño de muestra de garrapatas

Se consideró la proporción garrapata/perro de 2:1 (Unver *et al.*, 2001), el cual dio por resultado una población de 69 226; se consideró un índice de confianza de 95%, tomando en cuenta la seroprevalencia de 3%, la menor prevalencia esperada 2% (Stich *et al.*, 2008) y un α : 0.05 se obtuvo un tamaño de muestra de 278 garrapatas, un grupo de 2 garrapatas por perro (n = 139 pares de garrapatas).

6.4 Definición de Caso con Sospecha por el CDC

Aquellos que presenten antecedentes de mordedura por garrapata, fiebre acompañada de por lo menos alguna de las siguientes manifestaciones: cefalea, mialgia, trombocitopenia y/o transaminasas hepáticas elevadas, náuseas, vómito y comezón, además de antecedentes de infestación de garrapatas en perros.

6.4.1 Criterios de Inclusión

Pacientes con manifestaciones clínicas sugerentes a esta enfermedad; fiebre ($\geq 39.0^\circ\text{C}$), anorexia, pérdida de peso, epistaxis, melena, hemorragias en piel (petequias, equimosis, sufusión), con presencia y/o ausencia de garrapatas sin importar razas, sexo y edad. Las garrapatas fueron tomadas sobre los perros.

Se tomó sangre a dueños de pacientes y trabajadores de las clínicas veterinarias y refugios con antecedentes de mordedura de garrapata o contacto continuo con los perros y además coincidir con algunos signos clínicos compatibles con presentación de caso dentase a lo proporcionado por el CDC.

6.4.2 Criterios de Eliminación

A todos los pacientes con un tratamiento anterior de doxiciclina y por otro lado una muestra inadecuada.

6.5 Obtención y procesamiento de las muestras

La colección y procesamiento de las muestras se llevó a cabo durante los meses de julio del 2009 hasta agosto del 2010.

Las muestras de sangre de humanos y perros completa se tomaron de la vena radial, depositándose en tubos Vacutainer® 3 ml con EDTA anexando un formato para llenar (Anexo 1). Los pacientes sospechosos a ésta enfermedad se incluyeron sin importar raza, sexo ni edad y ausencia o presencia del vector.

El dueño del perro respondió unas preguntas del formato anexo (anexo 1); cuando respondió a alguna de las manifestaciones clínicas de manera afirmativa se le pidió una muestra de sangre, la cual se extrajo por una persona calificada para esa actividad.

6.5.1 Extracción de las garrapatas sobre el hospedero

Las garrapatas presentes sobre el perro, se colectaron vivas; colocándolas en un vial de 3cm de altura adicionándoles una torunda de agua para mantenerlas hidratadas hasta su procesamiento.

6.5.2 Disección de las garrapatas

En la platina de un microscopio estereoscópico se colocaron las garrapatas; sobre una cama de parafina sólida, se fijaron en los extremos con alfileres entomológicos. A través del microscopio con la cara ventral hacia arriba se hizo un corte transversal con navaja de bisturí estéril fraccionando la garrapata a la mitad desde la región lateral dividiéndola en dos partes y dejando al descubierto las estructuras glandulares e intestino medio. Estas se colocaron en un tubo de 1.5 ml con solución TBE para la extracción de DNA con QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA. USA).

6.5.3 Extracción de DNA de muestras de sangre de perros y humanos

La muestra sanguínea se colocó en un tubo con EDTA (2-2.5 ml) la cual se centrifugó y fue separada en 3 fases. La fase líquida o plasma se conservó en tubos de 1.5 ml conservados a -20 C, la fase celular intermedia corresponde a los glóbulos blancos (buffy coat) y el fondo del tubo los glóbulos rojos. El buffy coat fue extraído con una pipeta Pasteur estéril y colocado en un tubo Eppendorf de 1.5 ml para la extracción de DNA. Esta muestra se procesó mediante el equipo QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA. USA), acorde a las instrucciones que recomienda el laboratorio fabricante (anexos 2 y 3). Todas las muestras de glándulas salivales e intestino medio de las garrapatas se procesaron para la extracción de DNA (anexo 4).

6.5.4 Amplificación del PCR

Para el desarrollo de esta técnica se requirió una concentración mínima de 100ng de material genético. La taq polimerasa utilizada fue de Invitrogen® (Taq DNA polymerase, Recombinant. Hecha en Brasil).

Cuatro iniciadores correspondientes a los genes *gp36-L* y *16S rRNA* (cuadro 4). Los dos primeros correspondieron a una zona común entre diferentes especies de *Ehrlichia*, iniciador p36F-L 5' GGA ATG ATT TAT TAA AAA AGT TTG AC 3' y p36R-L 5' GAT CGT TGG ATG TTG G 3' esperando un fragmento de 386pb; en cuanto al segundo iniciador, que corresponde al gene *16Sr RNA* específico de *E. canis* fue dividido en dos grupos para facilitar su secuenciación; el primer grupo utilizó como iniciadores 15F 5' ATC ATG GCT CAG AAC GAA CG 3' y 842R 5' CTC ATC GTT TAC TCG GTG GAC T 3', mientras que para el segundo grupo se utilizó 537F 5' CAG CAG CCG CGG TAA TAC G 3' y 1442R 5' GTG ACG GGC AGT GTG TAC AAG 3', esperando fragmentos de 689pb y 1300pb respectivamente.

Los controles positivos fueron ADN positivos de roedor (LM1 y LM4), donados por el Laboratorio de Enfermedades Emergentes de la UIMEIP de HPCMN SXXI por medio del proyecto "Predicción de zonas de riesgo de adquisición de Enfermedad de Lyme en la República Mexicana y genotipificación de *B. burgdorferi* prevalente en garrapatas, reservorios y especímenes clínicos" CONACYT 87 868 SALUD 2008-1

Cuadro 4. Secuencias de los iniciadores utilizados para amplificar a los genes específicos de *Ehrlichia* spp. y *Ehrlichia canis*.

Gen	Iniciador	Tamaño del producto
<i>gp 36-L</i>	gp36F – L gp36R - L	386pb
<i>16S rRNA</i>	15F – 846R 556F – 1442R	689pb 1300pb

Para confirmar la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (anexo 5). Todas las PCR se procesaron en áreas separadas con campana de flujo, utilizando material desechable y estéril.

6.5.5 Purificación de los productos de PCR

Los mejores amplificadores positivos fueron secuenciados. Los productos de PCR se purificaron con el kit comercial de Qiagen (QiAquick Gel Extraction Minikit) Inc., Valencia, CA, USA (anexo 6).

6.5.6 Secuenciación

A partir de la purificación de los productos de PCR del gene *16S rRNA* (anexo 7), se verificó la integridad del amplificado mediante un gel de agarosa al 1%. Los productos de PCR positivos fueron secuenciados en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México con el equipo de Applied Biosystem y la enzima BigDye 3.0 usando el protocolo descrito por el fabricante de manera automatizada en base de datos se registra el electroferograma al término del programa y se hace la lectura de las secuencias. Los resultados de las secuencias se analizaron con el Software Chromas 223 para la búsqueda del homólogo más cercano mediante la página de Internet del NCBI: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Zhang *et al.*, 2000).

6.6 Análisis Estadístico

Las variables cualitativas se midieron en base a la prueba estadística Chi cuadrada o Prueba exacta de Fisher, dependiendo el tamaño de muestra considerado en cada variable.

VII. RESULTADOS

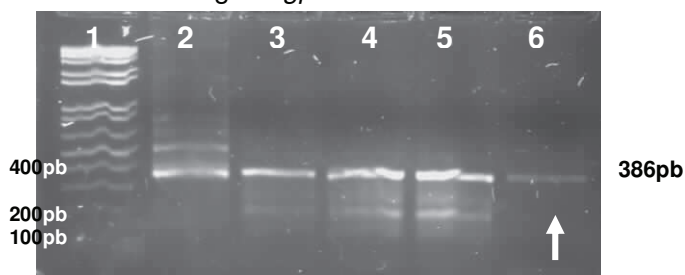
Fueron positivos 41 (27.52%) de 149 muestras de perros al gene *gp36-L* y 25 (17.98%) de 149 muestras al gene *16S rRNA*, en humanos 22 (20%) de 110 al gene *gp36-L* y 16 (16.4%) de 110 muestras y las garrapatas positivas fueron 32 (23.02%) de 139 y 29 (20.86%) de 139 de los genes *gp36-L* y *16S rRNA*, respectivamente (cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados generales de los productos PCR positivos de perros, humanos y garrapatas para los genes *gp36-L* y *16S rRNA*.

Especie	N	<i>gp36-L</i>	<i>16S rRNA</i>
Perros	149	41 (27.52%) /149	25 (17.98%) /149
Humanos	110	22 (20%) / 110	16 (16.4%) / 110
Garrapatas	139	32 (23.02%) / 139	29 (20.86%) / 139

En la figura 3, se muestran los resultados de amplificación de una PCR en gradiente para la estandarización de la prueba del gene *gp36-L* utilizando el control positivo de roedor LM1, utilizando diferentes temperaturas de alineamiento (46, 48, 50, 52 y 54°C) para eliminar bandas inespecíficas. La mejor temperatura para la amplificación del gene *gp36-L* es de 54°C.

Figura 3. Electroferograma productos de PCR en gradiente para determinar la mejor temperatura de alineamiento del gene *gp36-L*.

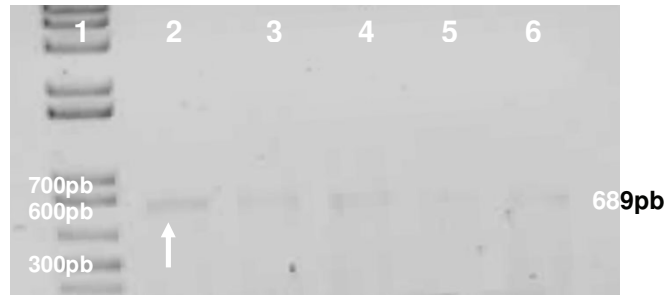


Carril 1. MPM 1kb Ladder, carril 2: control positivo (roedor LM1) a 46°C, carril 3: control positivo (roedor LM1) a 48°C, carril 4: control positivo (roedor LM1) a 50°C, carril 5: control positivo (roedor LM1) a 52°C y carril 6: control positivo (roedor LM1) a 54°C.

En la figura 4, se muestra los resultados de amplificación de una PCR en gradiente para la estandarización de la prueba del gene *16S rRNA* utilizando el control positivo de roedor LM4, se utilizan diferentes temperaturas de

alineamiento (48, 50.6, 51.8, 54.1 y 55°C) para eliminar bandas inespecíficas. La mejor temperatura para la amplificación del gene *16S rRNA* es de 48°C.

Figura 4. Electroferograma de PCR en gradiente para determinar la mejor temperatura de alineamiento del gene *16Sr RNA*.

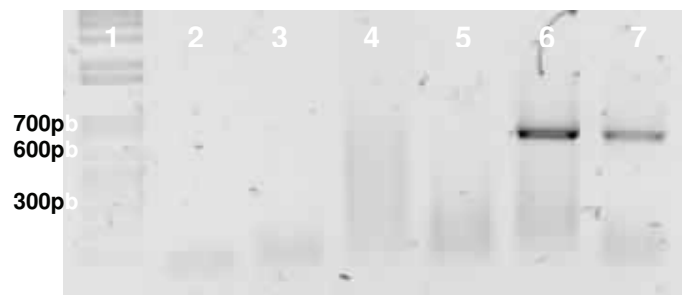


Carril 1. MPM 1kb Ladder, carril 2: control positivo (roedor LM4) a 48°C, carril 3: control positivo (roedor LM4) a 45.6°C, carril 4: control positivo (roedor LM4) a 51.8°C, carril 5: control positivo (roedor LM4) a 54.1°C y carril 6: control positivo (roedor LM4) a 55°C.

7.1 Detección de los genes *gp36-L* y *16S rRNA* en DNA de perros

Las 149 muestras colectadas de clínicas veterinarias y refugios de dos ciudades del estado de Sinaloa fueron procesadas para la búsqueda de los genes *gp36-L* y *16S rRNA*, donde 41 (27.52%) de 149 fueron positivas al gene *gp36-L*, posteriormente fueron amplificadas para la búsqueda del gene *16S rRNA* de las cuales 25 (17.98%) de 149 fueron positivas. Una muestra se eliminó por estar coagulada y así inadecuada para su procesamiento.

Figura 5. Electroferograma del producto PCR positivo para el gene *16S rRNA* y determinar la especie en perros.



Carril 1. MPM 1kb Ladder, carril 2 control negativo, carril 3 a 5: muestras negativa de perro, carril 6: muestra de perro positiva a *E. canis*, carril 7: control positivo LM4.

7.1.1 Manifestaciones clínicas de los perros PCR positivos

Las manifestaciones clínicas que predominaron en los perros con ehrlichiosis fueron: fiebre, náuseas, depresión, petequias y vómito; de los cuales es posible encontrar estas manifestaciones clínicas de 2 a 7 veces más significativo en los perros positivos que en los perros que no tienen esta enfermedad (cuadro 6).

Cuadro 6. Manifestaciones clínicas presentadas y valore de significancia de perros con ehrlichiosis monocítica.

Manifestación clínica	No. 149 (100%)	PCR		P	Odds Ratio IC (95%)
		Pos. N=48	Neg. N=101		
Fiebre	55 (36.9%)	32	23	0.0000002	6.78 (2.98-15.64)
Nauseas	13 (8.7%)	9	4	0.004	5.6 (1.46-23.15)*
Depresión	22 (14.8%)	14	8	0.0006	4.79 (1.69-13.85)
Petequias	35 (24.5%)	20	15	0.0003232	4.1 (1.73-9.79)
Vómito	23 (15.4%)	12	23	0.02	2.73 (1.01-7.39)
Epistaxis	17 (11.4%)	8	9	0.129	2.18 (0.70-6.73)
Anorexia	34 (22.8%)	15	19	0.92	1.96 (0.83-4.64)
Sec. Ocular	23 (15.4%)	10	13	0.21	1.78 (0.65-4.82)
Melena	13 (8.7%)	3	10	0.345*	0.61 (0.13-2.56)

* Prueba exacta de Fisher. Pos: Positivo, Neg: Negativo, IC: Intervalo de confianza.

7.2 Detección de los genes *gp36-L* y *16S rRNA* en DNA de humanos

Las muestras sanguíneas de los dueños y trabajadores en riesgo procedentes de clínicas veterinarias fueron procesadas para la búsqueda de los genes *gp36-L* y *16S rRNA* para *Ehrlichia* spp y *E. canis* respectivamente, donde 22 (20%) de 110 fueron positivas al gene *gp36-L* y 18 (16.4%) de 110 fueron positivas al gene *16S rRNA*.

Figura 6. Electroferograma del producto de PCR positivo para el gene *gp36-L* y determinar género en humanos.



Figura 7. Electroferograma del producto de PCR positivo para el gene *16S rRNA* y determinar especie en humanos.



Carril 1: MPM 1kb Ladder, carril 2: control positivo de roedor a especie LM4, carril 3 a 6: muestra positiva de humano al gene *16S rRNA*.

7.2.1 Manifestaciones clínicas de los humanos PCR positivos

Las manifestaciones clínicas que predominaron en los humanos con ehrlichiosis fueron 12 a 4 veces más frecuentes como: agotamiento, cefalea, fiebre, mialgias, depresión, vómito y nauseas que los que no tuvieron esta enfermedad (cuadro 7). Ocho de los humanos PCR positivos fueron asintomáticos.

Cuadro 7. Manifestaciones clínicas presentadas en humanos con ehrlichiosis y su valor de significancia.

Manifestación clínica	N= 110 (100%)	PCR		P	Odds Ratio IC (95%)
		Pos N=31	Neg N=79		
Agotamiento	38 (34.5%)	23	15	0.0000001	12.27 (4.18-37.28)
Cefalea	42 (38.2%)	23	19	0.00000012	9.08 (3.19-26.64)
Fiebre	31 (28.2%)	19	13	<0.0000035	8.04 (2.84-23.02)
Mialgia	39 (35.5%)	21	18	0.0000101	7.12 (2.60-19.91)
Depresión	24 (21.8%)	14	10	<0.000218	5.86 (1.95-16.86)
Vómito	24 (21.8%)	13	11	0.0014	4.46 (1.55-13.00)
Nauseas	27 (24.5%)	13	14	0.003089	3.82 (1.40-10.56)
Petequias	11 (10%)	6	5	NS	15 (2.05-140.00)*
Epistaxis	4 (3.6%)	1	3	NS	13.03 (0.94-409.43)*
Melena	5 (4.5%)	2	3	NS	3.67 (0.22-114.82)*
Anorexia	29 (26.4%)	12	17	0.0668	2.3 (0.85-6.23)

*Prueba exacta de Fisher. Pos: Positivo, Neg: Negativo, IC: Intervalo de confianza.

7.3 Detección de los genes *gp36-L* y *16S rRNA* en DNA de garrapatas

Se colectaron 139 grupos de 2 garrapatas cada uno, fueron eliminadas 12 garrapatas ya que no pudieron ser identificadas debido a la ausencia de gnatosoma. Los 139 grupos de garrapatas colectadas pertenecen a la familia

Ixodidae; de las cuales 128 (92.1%) fueron *R. sanguineus*, *D. variabilis* 6 (4.3%), *H. leporis-palustris* 3 (2.1%), *I. scapularis* 1 (0.72%) y 1 (0.72%) *Boophilus* spp.

De 139 procesadas; 32 (15.10%) de 139 fueron positivas a *gp36-L* y 29 (20.86%) de 139 al gene *16S rRNA*. La identificación, estadio y resultados de garrapatas se muestra en el cuadro 8.

Cuadro 8. Identificación, estadios y resultados a los genes *gp36-L* y *16S rRNA* de las garrapatas colectadas.

Identificación	No. Garrapatas	Estadio			Positivo (%)	
		Adulto		Ninfa	<i>gp36-L</i>	<i>16S rRNA</i>
		♂	♀			
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	128 (92.1%)	44	58	26	28 (87.5%)	27 (93.1%)
<i>Dermacentor variabilis</i>	6 (4.3%)	0	6	0	2(6.20%)	1(3.45%)
<i>Haemaphysalis leporispalustris</i>	3 (2.1%)	0	2	1	1(3.15%)	0
<i>Ixodes scapularis</i>	1 (0.72%)	0	1	0	1(3.15%)	1(3.45%)
<i>Boophilus</i> spp	1 (0.72%)	1	0	0	0	0
Total	139 (100%)	45	67	27	32 (100%)	29 (100%)

♂: Macho, ♀: Hembra.

Se encontraron 44 adultos machos, 58 adultos hembras y 26 ninfas de la garrapata *R. sanguineus*, 6 adultos hembras de la garrapata *D. variabilis*, 2 adultos hembras y una ninfa de la garrapata *H. leporis-palustris*, un adulto hembra de la garrapata *I. scapularis* y un adulto macho de la especie *Boophilus*.

Figura 8. Electroferograma del producto PCR positivos para el gene *16S rRNA* de garrapatas.

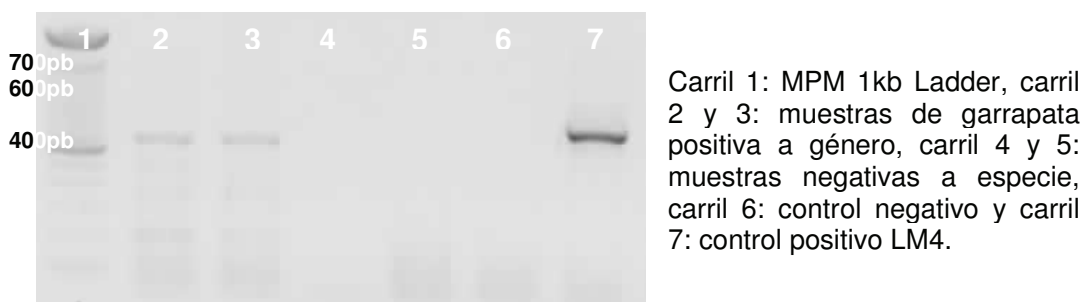
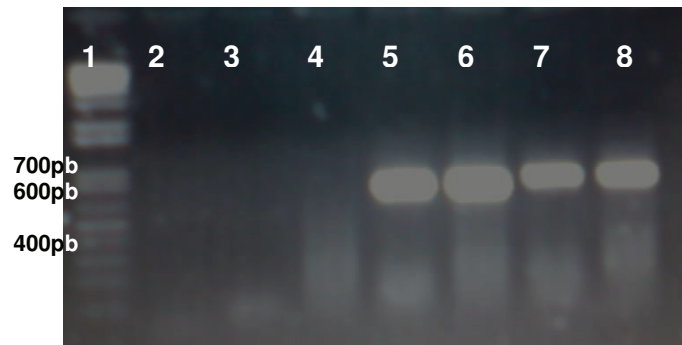


Figura 9. Electroferograma de productos PCR positivos al gene *16S rRNA* y determinar *Ehrlichia canis* en humano, perros y garrapatas.



Carril 1: MPM 1kb Ladder, carril 2: control negativo, carril 3 y 4: muestra negativas, carril 5: muestra de perro positiva a especie, carril 6: muestra de garrapata positiva a especie, carril 7: muestra de humano positiva a especie y carril 8: control positivo.

7.4 Evaluación de la transmisibilidad de la infección entre perros, garrapatas y humanos

Para la evaluación de la transmisibilidad de esta enfermedad entre perros, garrapatas y humanos se tomó en consideración el número de perros PCR positivos a ambos genes (48 perros), a los dueños de los perros PCR positivos (31 humanos) y las garrapatas positivas (40 garrapatas).

Se comparó los perros PCR positivos con sus dueños infectados en una tabla de dos por dos.

Se realizó la comparación de los resultados obtenidos entre humanos y perros, en el cual se encontró que del total de muestras analizadas (259), 13 (5.1%) concordaban en el resultado PCR positivo y en 193 (74.5%) en el resultado PCR negativo; en 18 (6.9%) muestras se obtuvo humanos PCR positivos mientras que perros fueron negativos, y en 35 (13.5%) el resultado fue a la inversa.

Estos datos fueron colocados en una tabla de dos por dos para su análisis en X^2 , dando por como resultado un OR: 3.98, un IC: 1.66-9.50, valor de P: 0.00036 con un α : 95%. Lo cual indica que los humanos con perros enfermos de ehrlichiosis están 4 veces más propensos a enfermarse que los humanos con perros sanos.

Se realizó la comparación de los resultados obtenidos de perros y garrapatas, se encontró un total 288 muestras analizadas, en 20 (7%) coincidieron en el resultado PCR positivo y en 220 (76.3%) en el resultado PCR negativo; en 28 (9.7%) perros PCR positivos con garrapatas negativas y en 20 (7%) el resultado fue al revés.

Estos datos fueron colocados en una tabla de dos por dos para su análisis en X^2 , dando por como resultado un OR: 7.86, un IC: 3.55-17.48, valor de P: 0.000001 con un α : 95%. Lo cual indica que los perros con garrapatas positivas a ehrlichiosis están 8 veces más propensos a enfermarse que los perros sin garrapatas.

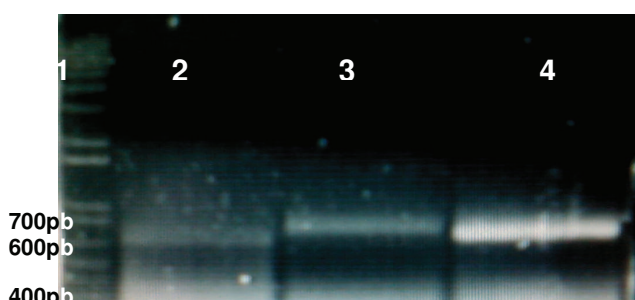
Se realizó la comparación de los resultados de humanos y garrapatas, donde se encontró un total 259 muestras analizadas, en 4 (1.5%) coincidieron en el resultado PCR positivo y en 192 (74.2%) en el resultado PCR negativo; en 27 (10.4%) humanos PCR positivos con garrapatas negativas y en 36 (13.9%) el resultado fue al revés.

Estos datos fueron colocados en una tabla de dos por dos para su análisis en X^2 , dando por como resultado un OR: 0.79, un IC: 0.22-2.57, valor de P: 0.67 con un α : 95%. Lo cual indica que las garrapatas positivas a ehrlichiosis son pocos significativas para enfermar a humanos y no hay diferencia estadística entre las garrapatas positivas y negativas.

7.5 Análisis de la reacción de secuenciación

Se hizo la selección de los amplificados positivos para género y especie que tuvieran una alta concentración, para el gene *16S rRNA*. La secuenciación se realizó para ambos iniciadores.

Figura 10. Electroferograma de productos de PCR positivos de humano, perro y garrapata para la secuenciación del gene *16S rRNA* para extracción y posterior secuenciación.



Carril 1. MPM 1kb Ladder, carril 2: muestra de humano positiva, carril 3: muestra de garrapata positiva y carril 4: muestra de perro positiva.

Figura 11. Electroferograma de productos de PCR purificados de humano, perro y garrapata para la secuenciación del gene *16S rRNA*

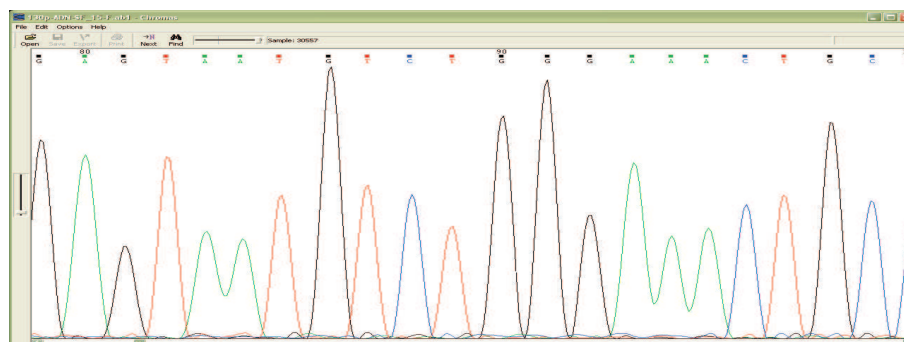


Carril 1: Marcador de masa, carril 2 y 3: muestras de humanos, carril 4: muestra de perro purificada, carril 5 y 6: muestras de garrapatas, carril 7: Marcador de peso molecular de 1kb Ladder.

Los amplificados se enviaron a secuenciar al servicio de secuenciación del Instituto de Fisiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los resultados de las secuencias se analizaron mediante el programa Chromas 233, este software permite hacer la búsqueda en el *GenBank* del homólogo más cercano a nuestra secuencia problema.

En la figura 12 se observa el fragmento de la secuenciación de la región del gene *16S rRNA* de *E. canis* amplificado a partir de DNA de sangre del perro.

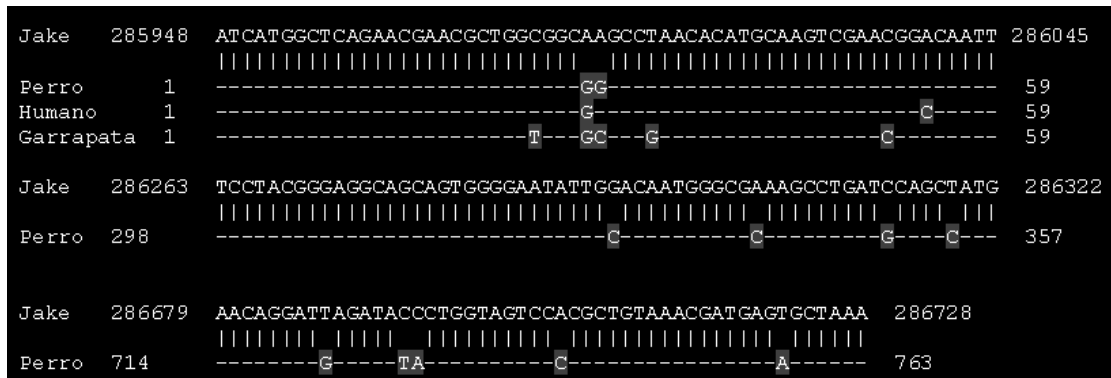
Figura 12. Fragmento de la secuencia de DNA amplificado en perro de la región 28598 a 28672 del gene *16S rRNA*.



Se hizo la búsqueda del homólogo en la base de datos de GenBank. Se encontró una homología de 86% con la región 285968 a 286728 de la cepa

Jake de *E. canis*, con 662/770 (86%) oligonucleótidos alineados y 2% (16/770) de lagunas (Figura 13).

Figura 13. Alineamiento de las secuencias de perro, humano y garrapata contra la cepa de referencia a *Ehrlichia canis*.



La secuenciación obtenida de los amplificadores de DNA de sangre y garrapata para el gene *gp36-L* no fue la optima debido a la mala calidad de la reacción, por lo que se espera repetir el proceso.

VIII. DISCUSIÓN

La ehrlichiosis monocítica canina es una enfermedad zoonótica emergente transmitida por la mordedura de la garrapata, capaz de producir manifestaciones clínicas de tipo hemorrágicas, siendo su diagnóstico diferencial: leptospirosis, babesiosis, rickettsiosis, anaplasmosis y la enfermedad de Lyme, esto debido a la amplia variedad de manifestaciones clínicas presentadas. El diagnóstico diferencial en perros sería moquillo canino, e incluso en hembras, piómetra. En humanos, además de las anteriores podríamos incluir fiebre del dengue, mononucleosis infecciosa, tifo murino, y tifo endémico (Pérez *et al.*, 2006).

La prevalencia encontrada en perros positivos a *E. canis* fue de 17.98%, similar a lo reportado en Brasil por Carvalho *et al.*, en 2003 con 17.8% y menor a lo reportado en Panamá (Dagnone *et al.*, 2003) de 22% y Bulla *et al.*, (2004) de 30.9% en perros de diferentes comunidades utilizando el gene *16S rRNA* donde el clima tiende a ser más húmedo que en Sinaloa. El estudio de seroprevalencia en Sinaloa reporto 74.5% (Sosa, 2007), esto puede ser debido a que solo demuestra la presencia de anticuerpos contra *E. canis* al igual que la técnica de IFA (Tami y Tami-Maury, 2004); por el contrario, la técnica de PCR basada en la amplificación del gene *16S rRNA* secuencia altamente conservada y en varias zonas geográficas puede distinguir entre las diferentes especies de *Ehrlichia* y varias cepas de *E. canis* (Siarkou *et al.*, 2007), obteniendo una sensibilidad y especificidad de 89 – 100% y 90 – 100% respectivamente (Agüero, 2002).

Las manifestaciones clínicas presentadas en los perros PCR positivos fueron; fiebre <40, petequias, vómito, náuseas y depresión, teniendo probabilidad de encontrar entre 3 a 7 veces que en perros sanos, estas manifestaciones resultan similares a las encontradas por McBride *et al.*, en 1995, donde estudiaron perros en la etapa aguda de la infección, predominando fiebre, petequias, epistaxis, depresión, vómito y náuseas, a excepción de la presencia de trombocitopenia, valor hemático que no fue evaluado debido a que no es uno de los objetivos de este estudio.

Se realizó un estudio de prevalencia en humanos, obteniendo un 20% (22) de 110 para el género *Ehrlichia* y un 16.4% (16) para *E. canis*, esto sugiere que solo en ese porcentaje es causante de la enfermedad y que la diferencia puede ser debida a que existen otras especies de *Ehrlichia*, como: *E. chaffeensis*, *E. ewingii* y *A. phagocytophilum*, causantes también de ehrlichiosis, no descartando una coinfección con estas especies al igual que en el caso de los perros positivos.

Las manifestaciones clínicas en humanos se limitan a las reportadas en Venezuela por Pérez *et al.*, en el 2006 los cuales fiebre (>39°C), náuseas, vómito, dolor abdominal, rash, artralgias y diarrea. En el presente las manifestaciones clínicas presentó: agotamiento, cefalea, fiebre, mialgia, depresión, vómito y náuseas, sugiriendo que los pacientes sospechosos de tener enfermedades febriles de etiología desconocida, fiebre del dengue, enfermedad de las montañas rocosas, influenza, mononucleosis infecciosa, meningitis viral o bacteriana y encefalitis pueden estar infectados por *E. canis* el cual es tratable con un diagnóstico temprano. Cada vez son más los países latinoamericanos donde se encuentran casos de ehrlichiosis, lo que nos hace pensar que se trata de una enfermedad que no se había tomado en cuenta en los diagnósticos diferenciales de las enfermedades febriles que aquejan a la población en general. Se debe tener en consideración el hecho de que Sinaloa es un estado endémico de dengue clásico y hemorrágico, así como ser uno de los estados en reportar desde 1985 la presencia de tifo endémico, tifo murino y fiebre manchada; diagnosticadas mediante serología y no descartando una reacción cruzada entre estas especies con *Ehrlichia* spp. (Mercado, 2010). Las diferencias antigénicas que se han encontrado entre las diferentes especies y cepas de Ehrlichias, y la falta de conocimiento pleno de la respuesta inmune que provocan en los pacientes, son un factor importante para detener el desarrollo de vacunas eficaces en el control de la enfermedad.

La garrapata *R. sanguineus* no ha sido seriamente investigada debido a que raramente se alimenta del hombre, se han encontrado casos de infestación humana en América central y sur, el 92.1% de las garrapatas totales (138)

fueron *R. sanguineus* de las cuales 28 fueron positivas al gene *gp36-L* y 27 al gene *16S rRNA*, se debe tener en consideración este como un vector hacia el humano. Se reportan dos garrapatas en estadio adulto de *D. variabilis* no reconocida como vector competente para *E. canis*, teniendo dos positivas para el gene *gp36-L* y una para el gene *16S rRNA*, además se reportó la presencia de *H. leporispalustris* de los cuales uno fue positivo al gene *gp36-L* que tampoco es conocida como un vector competente de ehrlichiosis se reporta la presencia de una garrapata *Boophilus spp* siendo negativa para ambos genes y se tiene el primer reporte para Sinaloa de la garrapata *I. scapularis* sobre un perro, además ser positiva para los dos genes. Esto sugiere que el panorama para la ehrlichiosis canina va ampliándose conforme se tienen más estudios de esta, y no descartarse la probable coinfección de *Ehrlichia* con otros agentes etiológicos causantes de enfermedades tanto en perros como en humanos y así agravar las manifestaciones que puedan ocasionar.

La comparación de resultados entre humanos y perros demuestra la transmisibilidad de *E. canis*, a través de un perro enfermo a su dueño. Los casos en que los humanos fueron positivos y su perro negativo pudiera ser debido a la fase en que se encuentra su mascota, ya sea etapa prodrómica de la enfermedad o en la fase crónica la cual se caracteriza por la migración de los organismos de *E. canis* a órganos como hígado, bazo y médula ósea principalmente y en algunos casos a cerebro y es muy difícil encontrarla en el torrente sanguíneo; esto por un lado, pero también la posibilidad de haber adquirido la enfermedad en viajes a zonas boscosas o al campo, las cuales son zonas donde el vector sobrevive de manera libre entre la fauna silvestre.

La exposición del perro a la garrapata es también un factor de riesgo para el y su dueño (Abarca *et al.*, 2008), siendo 8 veces mas probable encontrar un perro infectado de *E. canis* con garrapatas que uno sin garrapatas.

Los DNA secuenciados, obtenidos a partir de DNA de sangre presentaron una homología de 86% con respecto a la secuencia de referencia, el producto esperado de la amplificación era de 689pb, no obstante la amplificación fue de aproximadamente 780pb al igual que los resultados de la secuenciación.

El alto grado de conservación del gene *16S rRNA* para *Ehrlichia canis* en la región 286026 – 286499 demuestra que la proteína que esta codificando es de gran importancia para la invasión y persistencia de la infección en el hospedero. Las secuencias de humanos se amplificaron hasta la base 78, por lo que se supone tenga factores inhibidores lo cual impide la amplificación, esta técnica se realizó en el Instituto de Fisiología Celular y en la UIMEIP tres veces por personal capacitado y enzimas diferentes. Se espera la amplificación de un DNA de mejor calidad para las secuencias de humanos y poder compararlas, ya que la homología presentada fue de 68% con el gene *16S rRNA* de *E. canis*.

IX. CONCLUSIONES

Este estudio representa el primer reporte en el país en confirmar una zona endémica de ehrlichiosis monocítica en Sinaloa.

Se demuestra por primera vez la transmisibilidad de esta enfermedad del perro hacia el humano a través de la garrapata.

Los vectores competentes transmisores de las tres especies de *Ehrlichia* patógenas para el humano están presentes, por lo tanto se establece el ciclo enzoótico de la enfermedad para Sinaloa donde se tiene el reservorio, el vector y el humano.

Es el primer reporte de *I. scapularis* para Sinaloa.

Es el primer registro de prevalencia y manifestaciones clínicas de la enfermedad en humanos.

La exposición y contacto estrecho con mascotas enfermas de ehrlichiosis e infestadas de garrapatas elevan el riesgo de contraer esta enfermedad.

Las instituciones de salud, médicos y veterinarios deben integrar esta enfermedad hemorrágica emergente en el diagnóstico diferencial en humanos y perros.

X. LITERATURA CITADA

1. Abarca K. V., López J. P., González A. P., Dabanch P. J., Torres H. M., Solari G. V. y Perret P. C. (2008). Evidencia seroepidemiológica de exposición humana a *Anaplasma* spp en Santiago, Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 25 (5), 358-361.
2. Adrianzen G., J. Chávez y A. Casas. (2003). Seroprevalencia de la *Dirofilariasis* y *Ehrlichiosis* canina en tres distritos de Lima. *Revista de Investigación Veterinaria*, 14 (1), 43-48.
3. Agüero R. M. (2002). Diagnosis of granulocytic ehrlichiosis: State of the art. *Vector borne and zoonotic diseases*, 2 (4), 233-239.
4. Birchard S. J. y R. G. Sherding. (1996). *Saunders Manual of Small Animal Practice*. The Ohio State University: Columbus, Ohio. W. B. Saunders Company.
5. Blevins S. M., R.A.Grennfield y M.S. Bronze. (2008). Blood smear analysis in babesiosis, ehrlichiosis, relapsing fever, malaria and Chagas disease. *Clinic Journal of Medicine*, 75 (7), 521-530.
6. Bockino L., P. M. Krimer, K. S. Latimer y P. J. Bain. (2003). An overview of Canine Ehrlichiosis. *College of Veterinary Medicine GA*, 3 (6), 73-88.
7. Bowman D., S. E. Little, L. Lorentzen, J. Shields, M. P. Sullivan y E. P. Carlin. (2009). Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: Results of a national clinic-based serologic survey. *Veterinary Parasitology*, 16 (12), 138-148.
8. Breitschwerdt E. B., B. C. Hegarty y S. I. Hancock. (1998). Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella vinsonii*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol (n), 2645-2651.
9. Bulla C., R. K. Takahira, J. P. Araujo, L. A. Trinca, R. S. Lopes y C. E. Weidmeyer. (2004). The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in a endemic area. *Veterinay Res*. 35 (2), 141-146.

10. Carvalho F. S., A. A. Wenceslao, R. S. A. Carlos y G. R. Alburquerque. (2008). Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dog in Bahia, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 7 (3), 657-662.
11. Dumler J. S., A. F. Barbet, C.P. J. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa y F. R. Rurangirwa. (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*, description de *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51 (6), 2145-2165.
12. Dumler S. J., J. E. Madigan, N. Pusterla y J. S. Bakken. (2007). Ehrlichiosis in Humans: Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment. *Clin. Inf. Diseases. Anaplasma and Ehrlichia Infection (Suppl 1)*; 45, 45-51.
13. Gal A., E. Loeb, Y. Y. Mekuzas y G. Baneth. (2007). Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *The Veterinary Journal*. 175 (2), 212-217.
14. García A. C. y O. L. Núñez. (1996). Pancitopenia tropical en un perro. *Revista AMMVEPE*. 7(6), 235-236.
15. Georges K., C. D. Ezeokoli, A. Newaj-Fyzul, M. Campbell, N. Mootoo, A. Mutani y O. E. Sparagano. (2008). Animal Biodiversity and Emerging Diseases. *Annals of the New York Academic Sciences*, 1149, 196-199.
16. Ghorbel A., B. Clelrc y A. Djaiem. (1994). Canine ehrlichiosis in tunisia: seroepidemiological survey. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop*. 47 (3), 271-275.
17. Goddar J. (2000). *Infectious Diseases and Arthropods*. 2da. Edición. Humana Press, pp. 91-95.
18. Góngora B. R., V. J. Zavala, S. C. Castro y M. P Gonzales. (1999). First case of human Ehrlichiosis in Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 5 (3), 481.
19. Gordillo P., M. Vargas, S. Solórzano, O. Rivera, O. Polaco, L. Alvarado, O. Muñoz y J. Torres J. (2009). Demonstration of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* infection in ticks from the northeast of Mexico. *Journal Compilation European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15 (5), 496-498.

20. Guglielmone A., G. Bechara, P. Szabó, D. Barros-Batesti, J. Faccini, M. Cabrera, R. Vega, M. Ardua, M. Campos, J. Furlong, A. Mangold, J. Martins, M. Rodríguez, J. M. Venzal, y A. E. Peña. Guía Neotropical; Garrapatas de importancia médica y veterinaria: América latina y el caribe. www.cnog.com.mx/Sanidad/Garrapata/Guia_Neotropical_Esp.pdf
21. Guerrero R. E., S.A. Lozoya y F. J. Landeros. (1986). Garrapatas de animales domésticos en el área de influencia de la UAAAN. Folleto de divulgación de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 1 (14), 1-42.
22. Guzmán C. C., R. G. Robbins y T. M. Pérez. (2007). The Ixodes (Acari: Ixodidae) of Mexico: parasite-host and host-parasite checklists. *Zootaxa*, 15553, 47-58.
23. Hoffmann, A. y G. López-Campos. (2000). Biodiversidad de los ácaros en México. México. Fideicomiso Fondo de Cultura para la Biodiversidad. CONABIO.
24. Hoogstraal H. (1972). Bird as tick host and as reservoirs and disseminators of tickborne infectious agents. *Wiadomosci Parazytologiczne* 18(4-6), 703-706.
25. Hopla C. E., L. A. Durden y J. E. Keirans. (1994). Ectoparasites and classification. *Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 13 (4), 985-1017.
26. Inokuma H., T. Beppu, M. Okuda, Y. Shimada y Y. Sakata. (2003). Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. *Veterinary parasitology*. 115 (4), 343-348.
27. Iqbal Z., W. Chaichanasiriwithaya y Y. Rikihisa Y. (1994). Comparison of PCR with other test for early diagnosis of Canine Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (7), 1658-1662.
28. Iqbal Z. y Y. Rikihisa. (1994). Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs. *Veterinary Microbiology*, 7 (1), 281-287.
29. Jiménez C. M., O. C. Pérez, S. I. Vado, B. J. Rodríguez y P. A. Ortega. (2008). Serological survey of *Ehrlichia canis* in stray dogs from Yucatán, Mexico, using two different diagnostic test. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9 (2), 209-212.

30. León A., J. Demedio, M. Marques, E. Castillo, A. Perera, O. Zuaznabar, J. Caníbal, B. González, L. Reynaldo, N. Diaz, D. Blanco, M. Ronda, A. Peña y V. Seija. (2008). Diagnóstico de ehrlichiosis en caninos de la ciudad de la Habana. Memorias del XXI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Guadalajara, México. p. 1241-1261.
31. López J. D., M. S. Rivera, J. C. Concha, S. Q. Gatica, M. Loeffeolz y O. V. Barriga. (2003). Ehrlichiosis humana en Chile. Evidencia serológica. Revista Medica de Chile, 131(1), 67-70.
32. Mavromatis K., K. C. Doyle, A. Lykidis, N. Ivanova, M. P. Francino, P. Chain, M. Shin, S. Malfatti, F. Larimer, A. Copeland, J. C. Detter, M. Land, P. M. Richardson, X. J. Yu, D. H. Walker, J. W. McBride y N. C. Kyrpides. (2006). The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of membrane structure and immune evasion strategies. Journal of Bacteriology, 188 (11), 4015-4023.
33. Mercado U. M. C. (2010). Rickettsiosis: Historia y actualidades. Enfermedades Infecciosas y Microbiología, 30 (1), 25-31.
34. McBride J. W., R. E. Corstvet, S. D. Gaunt, J. Chinsangaram, G. Y. Akita y B. I. Osburn. (1996). PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 8 (4), 441-447.
35. McBride J. W., R. E. Corstvet, E. B. Breitschwerdt y D. H. Walker. (2001). Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with recombinant proteins. Journal of Clinical Microbiology, 39 (1), 315-322.
36. McBride J. W., C. K. Doyle, X. Zhang, A. M. Cardenas, V. L. Popov, K. A. Nethery y M. E. Woods. (2007). Identification of a glycosylated *Ehrlichia canis* 19-Kilodalton major immunoreactive protein with a species-specific serine rich glycopeptide epitope. Infection and Immunity. 75 (1), 74-82.
37. Neer, M. T. (2000). Ehrlichiosis: Ehrlichiosis monocítica y granulocítica canina. En G. Greene (Ed.) Enfermedades infecciosas en perros y gatos. (pp. 153-162).
38. Núñez O. L. (2000). Estudio de la seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en México. http://www.maicodemexico.com.mx/espanol/protocolo_canino.html

39. Oteo J. A. y P. Brouqui. (2005). Ehrlichiosis y anaplasmosis humana. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 23 (6), 375-380.
40. Parzy D., B. Davoust, G. Raphenon y E. Vidor. (1991). Canine ehrlichiosis in Senegal: human and canine seroepidemiological survey in Dakar. *Med. Trop.* 51 (1), 59-63.
41. Pérez M., M. Bodor, C. Zhang, Q. Xiong y Y. Rikisa. (2006). Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *New York Academy of Sciences*, 10 (78), 110-117.
42. Picazo J. J y A. F. Ortiz. (1999). Protocolos clínicos de diagnóstico serológicos comentados, diagnóstico por PCR. Obtenida el 18 de enero de 2011, de <http://consensos.org/protocol/sero09.htm>
43. Pusterla N., J. B. Pusterla y P. Deplazes. (1998). Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and granulocytic Ehrlichia infection in dogs in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (12), 3460-3462.
44. Rodríguez-Vivas R., R. E. F. Albornoz y G. M. Bolio. (2005). *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatán, México: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Veterinary Parasitology*, 12 (7), 75-79.
45. Rikihisa Y. (1991). The tribe Ehrlichieae and Ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 4 (3):286-308.
46. Sainz A., I. Amustegui, F. Rodrigues y M. A. Tesouro. (2003). La ehrlichiosis en el perro: Presente y Futuro. 9th Conference Society for Tropical Veterinary Medicine. Florida (USA).
47. Schmidt D. G y L.S. Roberts. (1981). *Foundations of Parasitology*. 2nd Ed. C. V. Mosby. 586-587pp.
48. Siarkou V.I., M. E. Mylonakis, E. B. Hatzopoulou y A. F. Koutinas. (2007). Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Microbiology*. 12 (5), 304-312.
49. Skotarczak B., M. Adamska y M. Supron. (2004). Blood DNA analysis for *Ehrlichia (Anaplasma) phagocytophila* and *Babesia spp.* of dogs from Northern Poland. *Acta Vet. Brno*, 7 (3), 347-351.

50. Sosa G. C. (2007). Comparación de diagnósticos para *Ehrlichia canis* mediante ELISA y frotis sanguíneo correlacionándolos con la trombocitopenia en canidos infectados naturalmente en Sinaloa, México. Tesis de Licenciatura de la Universidad Autónoma de Sinaloa de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
51. Sosa G. C. y M. T. Quintero. (2009). Prevalencia de *Babesia canis* en perros de clínicas y refugios de Mazatlán, Sinaloa. VIII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria y II Simposio Internacional de Resistencia a Pesticidas. Octubre. Mérida, Yucatán. 259.
52. Suksawat J., Y. Xuejie, S. I. Hancock, B. C. Hegarty, P. Nilkumhang y E. B. Breitswerdt. (2001). Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vector-borne pathogens in dogs from Thailand. J. Vet. Intern. Med. 15, 453-462.
53. Stich R. W., Y. Rikihisa, S. A. Ewing, G. R. Needham, D. L. Grover y J. Sathaporn. (2002). Detection of *Ehrlichia canis* in Canine carrier blood and individual experimentally infected ticks with a p30-Based PCR assay. Journal of Clinical Microbiology, 40 (2), 540-546.
54. Stich R. W., J. J. Schaefer, W. G. Bremer, G. R. Needham y S. Jittapalpong. (2008). Host surveys, ixodid tick biology and transmissions scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. Veterinary pathology, 158, 256 – 273.
55. Tamí I. C., y I. M. Tamí-Maury IM. (2004). Identificación morfológica de *Ehrlichia* spp. en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana, en Venezuela. Revista Panamericana Salud Pública. 16(5), 345-349.
56. Tinoco L., H. Quiroz, M. T. Quintero, T. B. Rentarúa, A. Barreras, S. Hori, G. López, A. R. Tamayo, V. A. Quezada, M. Moro y J. Vinasco. (2007). Seroprevalence of *Ehrlichia canis* in Mexico-U.S border desert region: pilot study. Animal and Veterinary Advances, 6 (5), 758-760.
57. Trapp S. M., A. S. Dagnone, O. Vidotto, R. L. Freire, A. M. Amude y H. S. Autran de Moraes. (2006). Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in hospital population. Veterinary Parasitology. 140 (3-4), 223-230.

58. Unver A., M. Pérez, N. Orellana, H. Huang, y Y. Rikihisa. (2001). Molecular and antigenetic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks and a human in Venezuela. *Clinical Microbiology*, 10 (2), 2788-2793.
59. Vazquez G. L. (1987). *Zoología del Phylum Arthropoda*. 6ta. Edición. México, 150-152.
60. Vinasco J., O. Li, A. Alvarado, D. Díaz, L. Hoyos, L. Tabachi, K. Sirigireddy, C. Ferguson y M. H. Moro. (2007). Molecular evidence of a new strain of *Ehrlichia canis* from South America. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (8), 2716-2719.
61. Walter D. H., C. D. Paddock y S. J. Dumler. (2008). Emerging and Re-emerging tick-transmitted rickettsial and ehrlichial infections. *Medical Clinics*, 92 (6), 1345-1361.
62. Waner T. y S. Harrus. (2004). Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME). *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. *J. Clin. Microbiology*, 37, 2745-2749.
63. Warner C. K y J. E. Dawson. (1996). Genus and species level identification of *Ehrlichia* species by PCR and Sequencing. En D. H. Persing (Eds.), *PCR protocols for emerging infectious diseases: a supplement to diagnostic molecular microbiology: principles and applications* (pp.100-105). California: Prensa Académica.
64. Zhang X., T. Luo, A. Keysary, G. Baneth, S. Miyashiro, C. Strenger, T. Waner y J. W. McBride. (2008). Genetic and Antigenetic Diversities of Major Immunoreactive Proteins in Globally Distributed *Ehrlichia canis* Strains. *Clinical and Vaccine Immunology*. American Society for Microbiology, 15 (7), 1080-1088.
65. Zhang Z., S. Schwartz, L. Wagner y W. Miller. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput Biology*. 7 (1-2), 203-214.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Formato para Clínicas Veterinarias.



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Área de Investigación en Parasitología Veterinaria



Id. Muestra: _____

Fecha ____ / ____ / ____

N. Paciente:	Raza:	
Edad:	Sexo	Macho Hembra

Paciente

Presencia de Garrapatas	No	Si		
Intensidad	Poco	Medio		Abundante
Fiebre	No	Si		_____ °C.
Presencia de Petequias	No	Si		
Pirexia	No	Si		
Melena	No	Si		
Anorexia	No	Si		
Depresión	No	Si		
Vomito	No	Si		
Otros.				

Propietario

Edad		Sexo	M	F	Tel: ()
Contacto con su mascota			Poco	Medio	Mucho

Le ha mordido una garrapata	No	Si
Fiebre sin causa	No	Si
Mareos	No	Si
Nauseas	No	Si
Dolor muscular	No	Si
Agotamiento	No	Si
Depresión	No	Si
Cefalea	No	Si

*Las garrapatas deberán estar plétoras y vivas. Colocarlas en un frasco con algodón húmedo y cerrarlo con microporo.

*La muestra se procesará en la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, IMSS.

Anexo 2. Preparación del Buffy Coat

El Buffy-coat es una fracción de sangre enriquecida de leucocitos. Preparar una fracción de buffy-coat de la sangre completa es simple y el rendimiento aproximado es de 5 a 10 veces más de un volumen equivalente de toda la sangre completa.

Prepara el buffy-coat centrifugando la sangre completa a 3300 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, existen tres diferentes fracciones distinguibles: la que esta en la cima es clara es el plasma; La que esta en la parte intermedia es el buffy coat, contiene el concentrado de leucocitos; y la que está en el fondo contiene el concentrado de eritrocitos.

Anexo 3. Extracción de ADN en Buffy Coat

1. Pipetear 20 µl proteasa QIAGEN (o proteasa K) hasta el fondo de un tubo de micro centrífuga de 1.5ml.
2. Adicionar 200 µl de la muestra al tubo de micro centrífuga. Usa 200 µl de sangre completa en 200 µl PBS.
3. Adicionar 200 µl el amortiguador AL a la muestra. Mezclar pulsando vortexing por 15 segundos.
4. Incubar a 56°C por 10 minutos. El DNA reacciona a un máximo después de la lisis por 10 minutos a 56°C.
5. Una breve centrifugación al tubo de micro centrífuga para remover el sobre nadante dentro de la tapa.
6. Adiciona 200µl de etanol (96 – 100%) de la muestra y mezcla otra vez pulsando vortexing durante 15 segundos. Después del mezclado, centrifuga brevemente el tubo de micro centrífuga para remover el sobre nadante dentro de la tapa.
7. Cuidadosamente aplica la mezcla del paso 6 a la QIAamp (en un tubo de 2ml) sin mojar el borde, cierra la tapa y centrifuga a 6000 x g (8000rpm) por un minuto. Coloca el QIAamp en un tubo de 2ml limpio (provisional), y desechar el tubo que contenía el filtrado.
8. Cuidadosamente abre el QIAamp y adiciona 500µl de amortiguador AW1 sin mojar el borde. Cierra la tapa y centrifuga a 6000 x g (8000rpm) por un minuto.

Coloca en QIAamp en un tubo limpio de 2ml (provisional) y deshecha el tubo que contiene el filtrado.

9. Cuidadosamente abre la columna QIAamp y adiciona 500µl del amortiguador AW2 sin mojar el borde. Cierra la tapa y centrifuga a velocidad máxima (20 000 x g; 14000rpm) por 3minutos.

10. Coloca el QIAamp en un tubo de micro centrífuga de 1.5ml y descarta el tubo que contiene el filtrado. Cuidadosamente abre el QIAamp y agregar 50 µl de agua destilada. Incuba en el cuarto a temperatura ambiente por 1 minuto y después centrifuga a 6000 x g (8000 rpm) por un minuto.

Anexo 4. Extracción de ADN en garrapatas

1. Cortar 25mg de tejido en pequeños trozos, ponerlos en un micro tubo de 1.5ml y adicionar 180µl de amortiguador ATL.

2. Adicionar 20 µl de Proteinasa K, mezclando mediante el vortex, e incubarlo a 56° C hasta que el tejido este completamente lisado.

3. Centrifuga brevemente en un micro tubo de 1.5ml con tapa removible.

4. Adiciona 200 µl de Etanol (96-100%) a la muestra, y mezcla con el vortex por 15 segundos. Después de mezclar, centrifuga brevemente en un micro tubo de 1.5ml.

5. Cuidadosamente aplique la muestra del paso 4 incluyendo el precipitado a la columna QIAamp en u tubo de colección de 2ml sin tirar en el riel. Cierre la trapa y centrifugue a 6000 x gramo (8000 rpm) por un minuto. Coloque el QIAamp en un tubo de colección de 2ml provisional y tire el contenido filtrado.

6. Con cuidado abre la columna y adiciona 500 µl de amortiguador AW1 sin derramarlo en el riel. Cierra la tapa y centrifuga a 6000 x gramo (8000 rpm) por un minuto.

7. Cuidadosamente abre Coloca la columna QIAamp y adiciona 500 µl de amortiguador AW2 sin derramarlo en el riel. Cierra la tapa y centrifuga a toda velocidad (20000 x gr; 14000 rpm) por 3 minutos.

8. Coloca la columna QIAamp en un tubo limpio de 1.5 ml y tira el contenido del filtrado. Cuidadosamente abre la columna QIAamp y adiciona 50 µl de agua

destilada. Incuba a temperatura ambiente por un minuto y después centrifuga a 6000 x gramo (8000 rpm) por un minuto.

Anexo 5. Electroforesis en gel de Agarosa al 1%.

1. Se prepara un gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X.
2. Se calienta hasta que se funda totalmente la agarosa y se adiciona Sybergreen 1% dependiendo del volumen de agarosa.
3. Se coloca el peine para la formación de pozos (0.5cm x 15 µl) correspondientes al número de muestras a analizar.
4. Se deja solidificar.
5. Juntar los productos de PCR.
6. A partir del volumen de los productos de PCR agregar el 4% de regulador de carga y mezclar.
7. Una vez teniendo el gel de agarosa solidificado con el número de pozos requerido, agregar a cada pozo el volumen de los productos de PCR y el regulador de carga.
8. conectar la cámara de electroforesis para un corrimiento de 85 volts por 55 min.
9. Observar las bandas en lámpara de U.V. y recortarlas lo más cercano a la banda.
10. Pesar el un tubo eppendorf de 1.5ml.
11. Ya recortada la banda meterla al tubo y volver a pesarlo.

Anexo 6. Extracción de producto de PCR de gel.

1. Pesar el fragmento de agarosa (máximo 100mg), colocarlo en un tubo de microcentrífuga con respecto al peso se le adiciona 3 volúmenes del regulador QG (100mg-300µl).
2. Incubar a 50°C por 10 min hasta disolver la agarosa, mezclar por vortex 2.3 min durante la incubación, el disuelto debe presentar un color amarillo intenso.
3. Agregar un volumen de isopropanol y mezclar (100mg ó 100µl).
4. El gel disuelto se pasa a través de la columna donde el volumen máximo es de 2ml.

5. Centrifugar 10000xg (13 000rpm) por 1 min.
6. Descartar el contenido del tubo colector.
7. Adicionar a la columna 500 μ l del regulador QG y centrifugar a 10000xg (13 000rpm) por 1 min.
8. Descartar el contenido del tubo colector.
9. Adicionar 750 μ l del regulador PE a la columna y centrifugar a 10000xg (13000 rpm) por 1 min.
10. Descartar el contenido del tubo colector.
11. Colocar la columna en un tubo eppendorf de 1.5ml.
12. Para eluir el DNA se adiciona 50 μ l del regulador EB y centrifugar a 1000xg (13 000 rpm) por 1 min.