



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“IDENTIFICACIÓN DE RICKETTSIAS POR TÉCNICAS MOLECULARES EN CANINOS
CAPTURADOS EN LA CIUDAD DE CHIHUAHUA, MÉXICO”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARCOS JAVIER SÁNCHEZ PÉREZ

TUTOR
HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ FES CUAUTITLÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. LUARY C. MARTÍNEZ CHAVARRÍA FMVZ-CU
DR. MARCO ANTONIO MUÑOZ GUZMÁN FES CUAUTITLÁN

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO JUNIO 2018



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.

“Live as if you were to die tomorrow. Learn as if you were to live forever.”

Mahatma Gandhi

No dejes de creer en tus sueños

Te fueron dados por alguna razón.

*“Educar a un hombre cuesta mucho,
pero no educarlo cuesta más”*

Jesús Reyes Heróles.

AGRADECIMIENTOS

- A mi hija Abigail Margarita Sánchez Pérez por ser el motor de mi vida y Olga por tu apoyo.
- Margarita, Elías, mis hermanos, cuñadas, Graciela, Norma, por estar presentes.
- Cecilia por la paciencia al enseñarme las PCR's.
- Graciela Castañeda gracias por enseñarme lo referente a laboratorio clínico.
- Hugo al aceptarme como tutor y apoyarme en estos 2 años de la Maestría.
- Dr. Jorge Benavides, Fernando Veleta y todos los del centro de control canino de la ciudad de Chihuahua.
- A los caninos que gracias a sus muestras se llevó a cabo este estudio.
- M en E. Susana por su ayuda científica y moral.
- Alejandro Buendía por ser mi compañero y amigo de la FESC.
- A mis sinodales Dr. Marco Muñoz, Dra. Luary, Dr. Juan Mosqueda y al Dr. Julio Figueroa.

- A los amig@s y compañer@s de la Maestría y del Laboratorio de Virología por adoptarme.

- A CONACyT por la beca otorgada durante 1 año.

- A la FESC-UNAM por ser parte de ella y darme la oportunidad de realizar la Maestría.

- ✓ **Este estudio fue llevado a cabo gracias al financiamiento de los proyectos:**
 - **Proyecto CONACyT 221285: “Genotipificación del gen *env* de retrovirus que impactan la salud de rumiantes domésticos”.**

 - **Proyecto PAPIIT IT201217: “ELISAs basadas en el uso de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos para la detección serológica de lentivirus en caprinos”.**

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por vectores en caninos son un problema emergente a nivel mundial debido a su frecuencia, morbilidad y su relevancia zoonótica. Las bacterias transmitidas por garrapatas *Ehrlichia canis* y *Rickettsia rickettsii* son los agentes causales de la Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC) y la Fiebre Maculosa de las Montañas Rocosas (FMMR) respectivamente. Basado en el hecho de que no existen estudios previos que determinen la frecuencia de la infección por CME y FMMR en la ciudad de Chihuahua, México utilizando técnicas de detección molecular, el objetivo del presente estudio fue detectar mediante la reacción en cadena de la polimerasa un fragmento del gen *gp36* de *Ehrlichia canis* y *ompA* de *Rickettsia rickettsii* en caninos capturados en el centro de control canino de la ciudad de Chihuahua, México. Se realizó la toma de sangre por punción de la vena safena o yugular de una población heterogénea (diferentes edades, sexo, razas, etc.) de caninos con presencia de garrapatas. La sangre se centrifugó para separar el plasma y los leucocitos de sangre periférica, a estas células se les realizó la extracción de ADN utilizando kits comerciales. El ADN se utilizó para la prueba de PCR con iniciadores que fueron diseñados considerando las regiones genéticas *gp36* y *ompA*. Algunos amplicones obtenidos fueron secuenciados y se analizaron con el uso de programas bioinformáticos. Los resultados mostraron una frecuencia de 16.2% (20/123) para CME y de 3.2% (4/123) para FMMR. Los análisis filogenéticos mostraron que 6 de las muestras secuenciadas correspondían a *Ehrlichia canis* y 4 a *Rickettsia rickettsii*, la asociación de las secuencias en los árboles filogenéticos mostraron una estrecha relación con secuencias disponibles en el GenBank de EE. UU. En conclusión, es la primera identificación molecular y estudio filogenético que determinó la infección de *Ehrlichia canis* y *Rickettsia rickettsii* en perros que habitan en la ciudad de Chihuahua, México.

Palabras clave: *Ehrlichia canis*, *Rickettsia rickettsii*, PCR, *gp36*, *ompA*.

ABSTRACT

Vector-borne diseases in canines are an emerging problem worldwide due to their frequency, morbidity and zoonotic relevance. The bacteria transmitted by ticks *Ehrlichia canis* and *Rickettsia rickettsii* are the causative agents of Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) and Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF) respectively. Based on the fact that there are no previous studies that determine the frequency of infection by CME and RMSF in the city of Chihuahua, Mexico using molecular detection techniques, the objective of the present study was to detect by means of the polymerase chain reaction a fragment of the *gp36* gene of *Ehrlichia canis* and *ompA* of *Rickettsia rickettsii* in canines captured in the canine control center of the city of Chihuahua, Mexico. The blood was taken by puncture of the saphenous or jugular vein of a heterogeneous population (different ages, sex, races, etc.) of canines with the presence of the vector. The blood was centrifuged to separate the plasma and leukocytes from peripheral blood, these cells were extracted DNA using commercial kits. The DNA was used for the PCR test with primers that were designed considering the genetic regions *gp36* and *ompA*. Some obtained amplicons were sequenced and analyzed with the use of bioinformatic programs. The results showed a frequency of 16.2% (20/123) for CME and 4.9% (4/123) for RMSF. The phylogenetic analyzes showed that 6 of the sequenced samples corresponded to *Ehrlichia canis* and 4 to *Rickettsia rickettsii*, the association of the sequences in the phylogenetic trees showed a close relationship with sequences available in the GenBank of USA. In conclusion, it is the first molecular identification and phylogenetic study that determined the infection of *Ehrlichia canis* and *Rickettsia rickettsii* in dogs that live in the city of Chihuahua, Mexico.

Key words: *Ehrlichia canis*, *Rickettsia rickettsii*, PCR, *gp36*, *ompA*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
INDICE DE FIGURAS	4
INDICE DE CUADROS	7
ABREVIATURAS	8
1. Introducción	10
2. Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC)	13
2.1 Antecedentes	13
2.2 Etiología	13
2.3 Genoma de <i>E. canis</i>	14
2.4 Vector	15
2.5 Patogenia	16
2.6 Respuesta inmune	19
2.7 Signos clínicos	20
2.8 Diagnóstico	20
2.8.1 Cultivo	20
2.8.2 Serología	21
2.8.3 Observación directa	22
2.8.4 Biología molecular	22
2.9 Tratamiento	23
2.10 Prevención	23
2.11 Salud pública	24
3. Fiebre Maculosa de las Montañas Rocosas (FMMR)	25
3.1 Antecedentes	25
3.2 Etiología	25
3.3 Genoma de <i>R. rickettsii</i>	27
3.4 Vector	27

3.5 Patogenia	28
3.6 Respuesta inmune.....	31
3.7 Signos clínicos.....	32
3.8 Diagnóstico.....	33
3.8.1 Cultivo	33
3.8.2 Serología	33
3.8.3 Biología molecular.....	33
3.9 Tratamiento	34
3.10 Prevención	34
3.11 Salud pública.....	34
4. JUSTIFICACIÓN.....	35
5. HIPÓTESIS.....	36
6. OBJETIVOS.....	37
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
7.1 Población de estudio	38
7.2 Muestras sanguíneas	39
7.3 Extracción de ADN	39
7.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	39
7.4.1. PCR gen <i>gp36</i> de <i>E. canis</i>	39
7.4.2. PCR gen <i>ompA</i> de <i>R. rickettsii</i>	42
7.5. Electroforesis.....	44
7.6. Purificación	44
7.7. Secuenciación, análisis y edición de secuencias	44
7.8 Análisis filogenético	44
7.9. Análisis estadístico	45
8. RESULTADOS.....	45
8.1 <i>Ehrlichia canis</i>	48
8.1.1. Muestras de caninos positivos por PCR a <i>E. canis</i>	49
8.1.2. PCR del gen constitutivo hipoxantín-guanín fosforribosil transferasa 1 (HPRT1)	53
8.1.3. Secuenciación	55

8.1.4. Análisis filogenético	58
8.1.5. Análisis estadístico	59
8.2 <i>Rickettsia rickettsii</i>	61
8.2.1. Muestras de sangre de caninos positivos a PCR de <i>R. rickettsii</i>	63
8.2.2 Análisis filogenético	64
9. Discusión	67
9.1 <i>Ehrlichia canis</i>	67
9.2 <i>Rickettsia rickettsii</i>	72
10. Conclusiones	75
11. BIBLIOGRAFÍA	76
12. ANEXO 1	89

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Árbol filogenético que muestra las relaciones genéticas de los miembros del orden <i>Rickettsiales</i>	14
Fig. 2	Patogénesis de <i>Ehrlichia canis</i>	18
Fig. 3	Prueba de SNAP 4Dx Plus donde se observa una reacción positiva a <i>Ehrlichia spp.</i> y <i>Anaplasma spp.</i>	21
Fig. 4	Mórulas de <i>Ehrlichia spp.</i> (flechas) en células de sangre periférica, con morfología variable	22
Fig. 5	Microfotografía con la tinción de Giménez del saco vitelino, revelando la presencia de las bacterias <i>Rickettsia rickettsii</i>	26
Fig. 6	Patogenia de la infección con <i>R. rickettsii</i> en perros.....	29
Fig. 7	Infección de la célula por <i>Rickettsia</i> y señalización celular.....	30
Fig. 8	Colonias en la ciudad de Chihuahua donde se realizó el muestreo en caninos apoyado por el centro de control.	38
Fig. 9	Condiciones de amplificación de la PCR-gp36 (primera ronda) para identificar <i>E. canis</i>	40
Fig. 10.	Condiciones de amplificación de la PCR gp36 anidada de <i>E. canis</i>	41
Fig. 11	Condiciones de amplificación de la PCR-ompA (primera ronda) para identificar <i>R. rickettsii</i>	42
Fig. 12	Condiciones de amplificación de la PCR <i>ompA</i> anidada de <i>R. rickettsii</i> ...	43

Fig. 13 Edades de los caninos muestreados y expresados en porcentajes.....	46
Fig. 14 Se muestra la presencia de una mórula (flecha amarilla) dentro de un neutrófilo.	47
Fig. 15 Productos de amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>gp36</i> de <i>Ehrlichia canis</i> separados por electroforesis en un gel de agarosa.....	49
Fig. 16 Resultados de la PCR para la detección de <i>E. canis</i> mostrados por sexo.	51
Fig. 17 Resultados de la PCR para la detección de <i>E. canis</i> mostrados por edad.	52
Fig. 18 Resultados de la PCR para la detección de <i>E. canis</i> mostrados por raza definida y mestizos.....	52
Fig. 19 Resultados de la PCR para la detección de <i>E. canis</i> mostrados por colonia de muestreo en la Ciudad de Chihuahua.....	53
Fig. 20 Se muestran amplicones positivos por la PCR de un fragmento del gen constitutivo <i>HPRT1</i> en muestras negativas a la PCR de <i>E. canis</i> , separados por electroforesis en geles de agarosa.	54
Fig. 21 Condiciones de amplificación de la PCR-HPTR1.....	55
Fig. 22 Se muestra el cromatograma obtenido de una secuencia nucleotídica de <i>E. canis</i> por el método Sanger.....	55
Fig. 23 Resultados de similitud entre una secuencia nucleotídica amplificada del gen <i>gp36</i> de <i>E. canis</i> obtenida en el presente estudio con las disponibles en el GenBank utilizando BLASTn.....	56
Fig. 24 Alineamiento de aminoácidos de la región genética <i>gp36</i> de <i>E. canis</i>	57
Fig. 25 Árbol filogenético realizado con secuencias nucleotídicas parciales del gen <i>gp36</i> de <i>Ehrlichia canis</i> de diferentes orígenes geográficos.....	58

Fig. 26 Diagrama circular donde se muestran los porcentajes de animales positivos a la PCR de <i>E. canis</i> por colonia en la Ciudad de Chihuahua.....	60
Fig. 27 Productos de amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>ompA</i> de <i>Rickettsia rickettsii</i> separados por electroforesis en un gel de agarosa.	62
Fig. 28 Cromatograma de una secuencia nucleotídica de <i>R. rickettsii</i>	62
Fig. 29 Se muestra el BLASTn de una muestra secuenciada.	63
Fig. 30 Árbol filogenético realizado con secuencias nucleotídicas parciales del gen <i>ompA</i> de <i>Rickettsia rickettsii</i> de diferentes orígenes geográficos	65
Fig. 31 Alineamiento de aminoácidos de la región genética <i>ompA</i> de <i>R. Rickettsii</i>	66

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Se muestran los diferentes antimicrobianos usados para el tratamiento en caninos por la infección de <i>Ehrlichia canis</i>	23
Cuadro 2 Reactivos de la mezcla de reacción de la PCR-gp36 (primera ronda) para identificar <i>E. canis</i>	40
Cuadro 3. Mezcla de reacción para la PCR-gp36 anidada de <i>E. canis</i>	41
Cuadro 4 Reactivos de la mezcla de reacción de la PCR-ompA (primera ronda) para identificar <i>R. rickettsii</i>	42
Cuadro 5 Mezcla de reacción para la PCR-ompA anidada de <i>R. rickettsii</i>	43
Cuadro 6 Colonias de la ciudad de Chihuahua donde se realizó el estudio, se muestra el número de muestras de caninos por colonia.	47
Cuadro 7 Iniciadores utilizados para la amplificación de un fragmento del gen <i>gp36</i> de <i>E. canis</i> por PCR anidada.	48
Cuadro 8. Muestras positivas por PCR anidada que amplificó un fragmento del gen <i>gp36</i> de <i>E. canis</i> a partir de leucocitos de sangre periférica de caninos.	49
Cuadro 9 Composición de la mezcla de la PCR para la amplificación de un fragmento del gen <i>HPRT1</i>	54
Cuadro 10 Frecuencias de animales positivos por PCR a <i>E. canis</i> entre colonias donde se realizó el muestreo en la Ciudad de Chihuahua.	59
Cuadro 11 Iniciadores utilizados para la amplificación por PCR anidada de <i>R. rickettsii</i>	61
Cuadro 12 Muestras positivas por PCR anidada que amplificó un fragmento del gen <i>ompA</i> de <i>R. rickettsii</i> a partir de leucocitos de sangre periférica de caninos.	64

ABREVIATURAS

ECM: Ehrlichiosis Monocítica Canina

FMMR: Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CVBD: Canine Vector-Borne Diseases

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

pb: pares de bases

ARN: Ácido ribonucleico

µm: micrómetro

Th1: linfocito T helper 1

Th2: linfocito T helper 2

IgG: inmunoglobulina G

VO: vía oral

IV: intravenoso

SC: subcutáneo

HME: Ehrlichiosis Monocítica Humana

USA: Estados Unidos

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CID: Coagulación Intravascular Diseminada

CD8+: Linfocitos T citotóxicos

CD4+: linfocitos T cooperadores

IgM: inmunoglobulina M

gbm: grado biología molecular

μM: Micromolar

nM: nanomolar

μL: microlitro

ng: nanogramos

DNTP's: desoxirribonucleótidos

° C: grados Celsius

Fw: Forward

Rv: Reverse

HPRT1: hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa 1

1. Introducción

Las enfermedades transmitidas por vectores en caninos (CVBD's por sus siglas en inglés) son un problema emergente a nivel mundial debido a su frecuencia, morbilidad y su relevancia zoonótica (Day, 2011). Las CVBD's son causadas por un diverso rango de patógenos, principalmente bacterias y parásitos, los cuales se transmiten a los caninos por diferentes artrópodos vectores, particularmente garrapatas e insectos (Otranto, 2009). En general, México no se encuentra excluido de estas infecciones no solo en perros si no en humanos, en las cuales se han presentado apariciones insospechadas de casos como el ocurrido a principios del año 2009, en que se detectó un brote de casos y defunciones por rickettsiosis en el municipio de Mexicali, BC., transmitidas por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Bustamante, 2010). En el año 2012 en el Estado de Chihuahua se describieron 30 casos sospechosos de los cuales fueron confirmados 6 con la presencia de rickettsias (20%), 3 de Ciudad Juárez, 2 de la capital de Chihuahua y un caso de Guachochi. Más tarde, en el año 2014 se notificaron 5 casos sospechosos de rickettsiosis, confirmándose tres de ellos (SSA, 2014). En Estados cercanos (Sonora, Coahuila, Sinaloa, Nuevo León y Baja California) también se han reportado casos y defunciones en humanos por estos patógenos. El 15 de noviembre del año 2012, el Comité Nacional de Vigilancia Epidemiológica (CONAVE), emitió un aviso dirigido a todas las unidades de vigilancia epidemiológica del país y los centros estatales de enlace para el reglamento sanitario internacional, sobre el incremento de rickettsiosis en el Estado de Coahuila (SINAVE, 2012). A partir de ese momento, la vigilancia de este padecimiento se intensificó en el ámbito epidemiológico, particularmente en los reportes semanales de problemas producidos por vectores (SINAVE, 2014).

Es común encontrar información en la prensa de estos Estados, que alerta a la población sobre las características de la enfermedad y medidas de prevención, además realizan programas para combatir la garrapata en animales portadores a través de la aplicación de antiparasitarios (Márquez, 2012).

Los caninos pueden ser infectados de manera simultánea con más de un agente vectorial que a su vez este infectado con un solo microorganismo o diferentes (Otranto, 2009; Cardoso, 2010). La garrapata café del perro, *Rhipicephalus sanguineus*, es el ectoparásito más común de los caninos (Dantas-Torres y Otranto, 2011). Aunque comúnmente se asocia a regiones tropicales y subtropicales, se ha encontrado en áreas áridas y secas. Por ejemplo, del 20 al 59% de los caninos atendidos en clínicas veterinarias en la región del centro (Cruz-Vázquez y García-Vázquez, 1999) y noroeste de México están infestados con *Rhipicephalus sanguineus* (Tinoco-Gracia *et al.*, 2009).

En Chihuahua, Márquez en 2012 analizó un total de 196 ejemplares de garrapatas, de las cuales el 12.2% provenían de la colonia Revolución, el 29.1% fueron obtenidas de la colonia Ampliación Nuevo Triunfo y el 58.7% restante fue producto de un muestreo realizado con apoyo de una campaña de esterilización de mascotas que tuvo efecto en un centro comunitario, localizado cerca de ambas colonias del estudio, lo que permitió tener un panorama más amplio del área geográfica original, cabe señalar que aunque el evento de esterilización fue fortuito, la toma de muestras fue supervisada. Todas las muestras de garrapatas obtenidas fueron del género *Rhipicephalus spp.*

En un trabajo realizado por Núñez Ochoa en 2003 en el Estado de Chihuahua, muestrearon 148 perros encontrando 66% de los animales positivos a la presencia de anticuerpos contra rickettsias utilizando una prueba de SNAP.

Desde que se describió la presencia por serología de la EMC en México en 1996 hasta el 2003, no se había logrado identificar molecularmente los agentes etiológicos transmitidos por garrapatas en el perro, únicamente se tenían reportes de exposición a *Ehrlichia canis* mediante el uso de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Núñez, 2003; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005). Sin embargo, la parasitemia cíclica de muchos de estos microorganismos transmitidos por vectores (Harrus *et al.*, 1997) y la reactividad

cruzada serológica entre especies (Dreher *et al.*, 2005) dificulta el diagnóstico (Ferreira *et al.*, 2007).

La primera descripción de *E. canis* en Norte América fue en USA, de un canino en Oklahoma que fue coinfectado con *Babesia canis* (Ewing, 1963).

En un estudio de muestras de sangre de 65 perros infestados con garrapatas del norte de Oklahoma., solo 10 (15.4%) perros fueron positivos a *Ehrlichia spp.* por PCR, de estos 4 (6.2%) muestras se identificaron con la presencia de *E. ewingii*, 2 (3.1%) con *E. canis* y 4 (6.2%) con *E. chaffeensis*, mientras que solo 7(10.8%) fueron seropositivos a la prueba de Inmunofluorescencia para *E. canis* o *E. chaffeensis* (Murphy *et al.*, 1998).

R. rickettsii, es el agente etiológico de la Fiebre Maculosa de las Montañas Rocosas (FMMR) (Raoult *et al.*, 1996). Su presencia se asocia con las garrapatas, que viven en climas cálidos (Anderson *et al.*, 2008). La FMMR es una enfermedad reemergente en Sonora, al noroeste de México, así como, en otras regiones del país (México: Secretaría de Salud, 2013), con una creciente incidencia y elevada letalidad. En México se transmite por la picadura de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, parásito común en los perros (Tinoco-Gracia, L. *et al* 2009).

2. Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC)

2.1 Antecedentes

La EMC ha sido descrita en diferentes países alrededor del mundo, pero es mucho más frecuente en regiones tropicales. La primera publicación de la infección de EMC en caninos fue en Argelia en 1935 (Donatien y Lestoquard, 1936). Estudios respecto a la distribución de *Ehrlichia canis* y otros organismos relacionados pueden ser complicados debido a las dificultades asociadas a la sensibilidad y especificidad de las pruebas para la detección de estas bacterias, incluyendo reacciones cruzadas de patógenos estrechamente relacionados, ocasionando detección de seronegativos pero PCR positivos, PCR negativos pero seropositivos o PCR negativos pero cultivos positivos (Stich *et al.*, 2008).

2.2 Etiología

La familia *Anaplasmataceae*, se clasifica en la clase *Alfaproteobacteria* que incluye los géneros *Anaplasma* y *Ehrlichia* (**figura 1**). Estos organismos son Gram negativos, intracelulares obligados que habitan dentro de las vacuolas y se multiplican cerca de la membrana, son transmitidos por garrapatas de la familia *Ixodidae*, causando enfermedades fatales en humanos, animales domésticos y fauna silvestre (Rar y Golovljova, 2011). Se ha propuesto una clasificación filogenética basada en los genes *16S rRNA*, *groESL* y genes que codifican proteínas de superficie (Dumler *et al.*, 2001). Los avances recientes en el mapeo de las proteínas superficiales y la dinámica de los patógenos ha llevado a una mayor comprensión de cómo abordar el desarrollo de vacunas para el control de estas enfermedades (de la Fuente *et al.*, 2010). El género *Ehrlichia* spp. en vertebrados infecta monocitos, multiplicándose cerca de las membranas formando inclusiones conocidas como colonias o mórulas. En el vertebrado y el vector el ciclo de infección incluye dos fases: a) una reticular que es una forma vegetativa que se divide por fisión binaria y no puede sobrevivir de manera extracelular y b) una forma densa, usualmente cocoide o elipsoidal que puede sobrevivir fuera de la célula, la cual es la forma infectiva (McDade, 1990). La forma densa entra a la

célula del hospedero vía receptores y mediada por endocitosis, para formar un endosoma único (fagosoma) (Kocan *et al.*, 2004; Ismail *et al.*, 2010).

Algunos microorganismos relacionados estrechamente a *E. canis*, incluyen *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Neorickettsia risticii* (figura 1), los cuales pueden causar enfermedades atípicas en caninos (Dawson y Ewing, 1992; Kakoma *et al.*, 1994; Rikihisa, 1991).

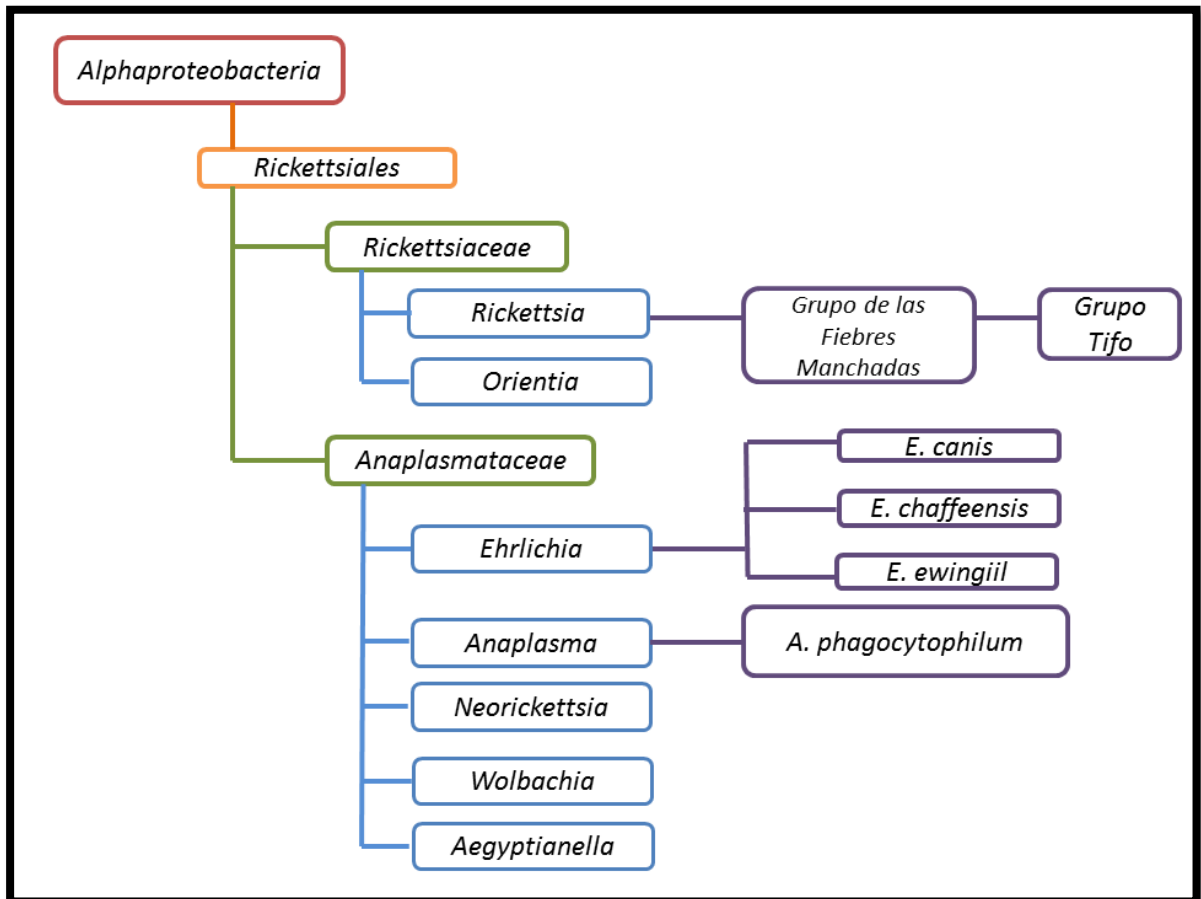


Fig. 1 Árbol filogenético que muestra las relaciones genéticas de los miembros del orden Rickettsiales (Basado en Brenner *et al.*, 2005).

2.3 Genoma de *E. canis*

La secuencia genómica completa de *E. canis* ha sido publicada y consiste en un cromosoma circular de 1, 315,030 pb que incluye un total de 984 genes de los

cuales se generan: 925 proteínas, 40 especies de ARN estables, además de 17 pseudogenes y una proporción de secuencias no codificantes (27% de los 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) (Mavromatis *et al.*, 2006). Varias de estas proteínas son consideradas como proteínas mayores inmunoreactivas y han sido estudiadas, incluyendo la gp200, gp140, gp36 y gp19 (Doyle *et al.*, 2006; McBride *et al.*, 2003; McBride y Walker, 2003). La gp36 de *E. canis* es una proteína rica en serinas y es reconocida por anticuerpos principalmente dirigidos a un epítipo ubicado en la región repetida en tándem (Doyle *et al.*, 2006).

2.4 Vector

En la garrapata (vector) *Ehrlichia canis* primero invade las células del epitelio del intestino delgado, donde forma grandes colonias unidas a la membrana conteniendo numerosos organismos. La forma reticular que se divide vía fisión binaria se transforma en la forma densa infectiva. El patógeno infecta otros tejidos del vector, como la glándula salival donde las bacterias se transmiten al hospedero vertebrado durante la alimentación de la garrapata (Kocan *et al.*, 2003, 2004, 2010a).

Desde un punto de vista etológico, *R. sanguineus* es endofílico (adaptado a la vida en interiores), monotrópico (todas las etapas de desarrollo se alimentan de la misma especie hospedadora) y de tres hospederos (cada etapa de la vida requiere un nuevo hospedador para alimentarse). Sin embargo, aunque *R. sanguineus* es altamente endofílico, también puede sobrevivir en entornos al aire libre, principalmente si hay refugios disponibles (por ejemplo, paredes de piedra caliza). Además, aunque es monotrópico, esta garrapata puede ocasionalmente alimentarse de otros hospederos (por ejemplo, humanos), que no pertenecen a su cadena trófica natural. Estos hechos indican que *R. sanguineus*, puede adoptar

diferentes estrategias de supervivencia, según sea necesario (Dantas-Torres, 2010).

Se sabe que *Rhipicephalus sanguineus* tiene la capacidad de transmitir varios patógenos como *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia rickettsii* y *Ehrlichia chaffeensis* (Sosa-Gutiérrez *et al.*, 2016).

En los caninos debilitados con altas infestaciones, *R. sanguineus* es el vector primario de *Ehrlichia canis* causante de la Ehrlichiosis Monocítica Canina (Otranto *et al.*, 2009).

Se ha puesto menos atención a la caracterización de *Ehrlichia canis* dentro de los vectores. *R. sanguineus* y *Dermacentor variabilis* han demostrado a nivel experimental que son vectores competentes de este parásito (Bremer *et al.*, 2005; Groves *et al.*, 1975).

2.5 Patogenia

E. canis 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 (Waner y Dawson, 1996).

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 la siguientes 2 a 4 semanas, los organismos se multiplican en las células fagocíticas mononucleares que están circulando sin llegar a hígado, bazo y linfonodos. Las células infectadas son transportadas por la circulación sanguínea al resto del cuerpo con predilección a los pulmones, riñones y las meninges. 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. Todas las etapas se caracterizan por la persistencia de trombocitopenia (Waner y Harrus, 2004).

Las células parasitadas por *E. canis* son encontradas en la microvasculatura del pulmón, riñón y meninges. La epistaxis es causada por la hemorragia característica en pulmón o mucosa nasal. La trombocitopenia en esta infección puede ser inmunomediada (Rikihiya, 1991). La destrucción inmunológica de las plaquetas se produce en la forma aguda, encontrando anticuerpos antiplaquetarios en casos clínicos y experimentales. Otros factores, como el secuestro esplénico y la producción del factor de inhibición de la migración plaquetaria, también están implicados en la patogenia de la trombocitopenia. La infección subclínica persistente del microorganismo es debida al secuestro esplénico. La etapa crónica puede ser potencialmente mortal después de una infección persistente y estar asociada con el daño irreversible a la médula ósea (**figura 2**) (Birtles *et al.*, 2016).

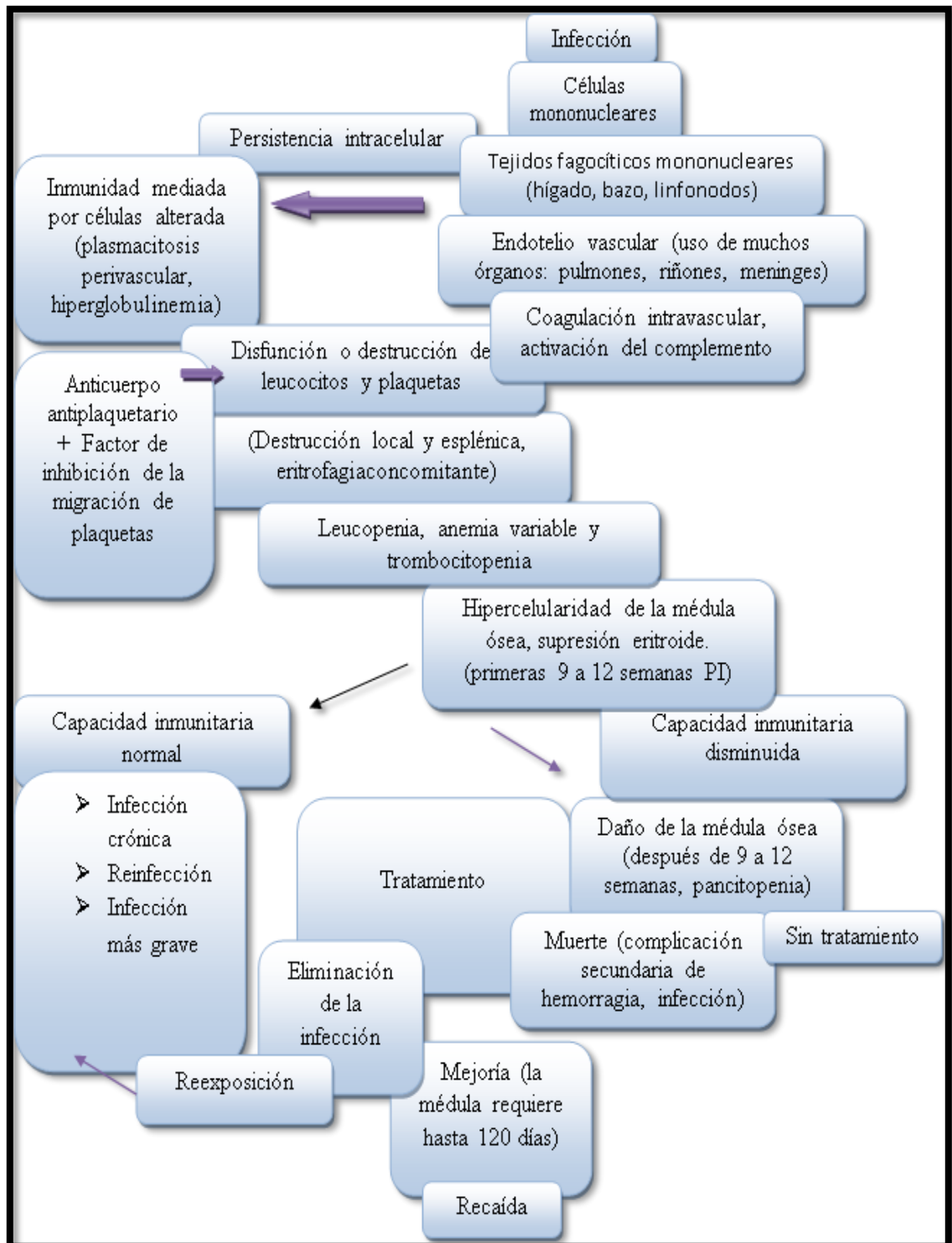


Fig. 2 Patogénesis de *Ehrlichia canis* (Green, 2000).

2.6 Respuesta inmune

Algunos estudios recientes sugieren que los componentes de la saliva o secreciones intestinales introducidos durante la alimentación de la garrapata producen cambios en la actividad inmunológica a nivel de la piel y en los linfonodos (Willadsen y Jongejan, 1999). El efecto de la saliva sobre la respuesta inmune del hospedero incluye la inhibición de la respuesta de las células T a la concavalina A. Se han encontrado en la saliva inmunoglobulinas y proteínas de unión a histamina, cualquiera de estos dos componentes podrían reducir el rechazo de garrapatas y facilitar la transmisión de microorganismos. Esta evidencia se ha descrito en infestaciones con *R. sanguineus*, identificando cambios en la actividad protectora normal de los linfocitos Th1 y en un perfil de citocinas Th2 aberrantes, lo cual está relacionado con la resistencia a las infecciones transmitidas por vectores (Ferreira y Silva, 1999). Estos cambios inmunomodulatorios locales favorecen la transmisión de organismos infecciosos no solo al hospedero, sino también a las garrapatas durante la alimentación (Labuda *et al.*, 1997). Después de la transmisión exitosa de los patógenos se generan alteraciones inmunológicas que permiten que se presenten los signos clínicos de la enfermedad, sin embargo, a pesar de la terapia antimicrobiana, los animales con una respuesta inmune protectora incompleta comúnmente desarrollan una infección subclínica persistente y puede reincidir con el estrés o con enfermedades recurrentes como Lyme (Straubinger *et al.*, 1997). Es probable que los patógenos transmitidos por garrapatas contribuyan significativamente a un considerable incremento en el número de perros con "pirexia de origen desconocido", linfadenopatía, anemia cíclica crónica, trombocitopenia, poliartropatía, uveítis o vasculitis. Si continúa la antigenemia se puede generar una enfermedad inmunomediada polisistémica. Los animales infectados comúnmente tienen niveles elevados de IgG que se pueden detectar con las pruebas de IFA (inmunofluorescencia indirecta) y ELISA, además gammapatías monoclonales o policlonales y formación de inmunocomplejos. Los mecanismos inmunológicos pueden resultar en anemia hemolítica positiva a Coomb's, trombocitopenia o

poliartropatia (Straubinger *et al.*, 1997; Adachi *et al.*, 1992; Grindem *et al.*, 1999., Baticados, 2011).

2.7 Signos clínicos

Las infecciones subclínicas pueden persistir por meses o años, antes de que se produzca la eliminación inmunológica o el desarrollo de una manifestación crónica (Breitschwerdt *et al.*, 2014). La severidad de la enfermedad depende del estado inmune del hospedero, edad, raza y coinfecciones que pueda presentar. Las manifestaciones clínicas pueden variar de la ubicación geográfica (Vinasco *et al.*, 2007), pero en general, los signos clínicos que se observan con frecuencia son letargia, anorexia, baja de peso, fiebre, epistaxis y otros desórdenes hemorrágicos, mucosas pálidas y linfadenomegalia (Lakkawar *et al.*, 2003).

2.8 Diagnóstico

El diagnóstico de las enfermedades transmitidas por vectores requiere una combinación de hallazgos clínicos y de laboratorio, visualización microscópica directa o inmunodetección de organismos infecciosos en sangre o tejido infectado, cultivo microbiano, pruebas serológicas, inmunoblotting y PCR. El inconveniente con la detección del cuadro clínico es que la enfermedad tiende a la cronicidad o a ser subclínica, adicionalmente en estos animales infectados la observación directa del microorganismo es difícil, no obstante, con el uso de técnicas inmunohistoquímicas se aumenta la sensibilidad (Birtles *et al.*, 2016).

2.8.1 Cultivo

El aislamiento de *Ehrlichia spp.* en cultivo celular requiere experiencia y generalmente está restringido a laboratorios de investigación. Las bacterias requieren líneas celulares específicas como reticuloendotelial o derivadas de células del vector (garrapatas). Para *Ehrlichia spp.* se pueden utilizar las líneas celulares DH82 (histiocitos de canino) y HMEC-1 (células endoteliales humanas) (Allison y Little, 2013).

2.8.2 Serología

Las técnicas serológicas son las más frecuentemente usadas como métodos de diagnóstico como la IFI y ELISA. La técnica de western blot se ha usado para caracterizar y diferenciar especies de *Ehrlichia* (Birtles *et al.*, 2016).

Diferentes ensayos basados en pruebas inmunoenzimáticas se han descrito a nivel clínico como la inmunocromatografía de flujo lateral (SNAP) 3DX, 4DX, 4DX Plus series (IDEXX Laboratories, West- brook, ME, USA), los cuales detectan anticuerpos específicos contra péptidos recombinantes derivados de las proteínas bacterianas. Estos ensayos se basan en la respuesta del hospedero a las proteínas de membrana externa de *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma platys* (**figura 3**) (Allison y Little, 2013).

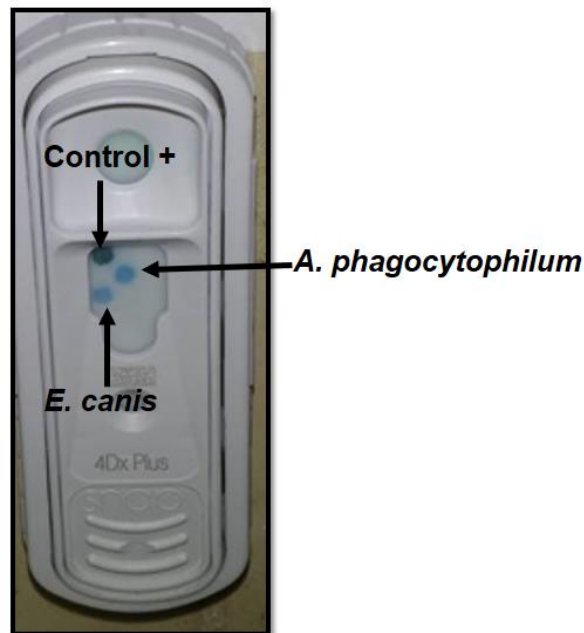


Fig. 3 Prueba de SNAP 4Dx Plus donde se observa una reacción positiva a *Ehrlichia spp.* y *Anaplasma spp.* (<http://www.idexx.es/smallanimal/inhouse/snap-in-house-tests.html>).

2.8.3 Observación directa

El diagnóstico de *E. canis* por observación directa se basa en la visualización de mórulas en los monocitos circulantes (**figura 4**) (Waner y Harrus, 2004).

Las evaluaciones microscópicas y serológicas, en conjunto con los signos clínicos permiten un diagnóstico confiable (Vinasco *et al.*, 2007).

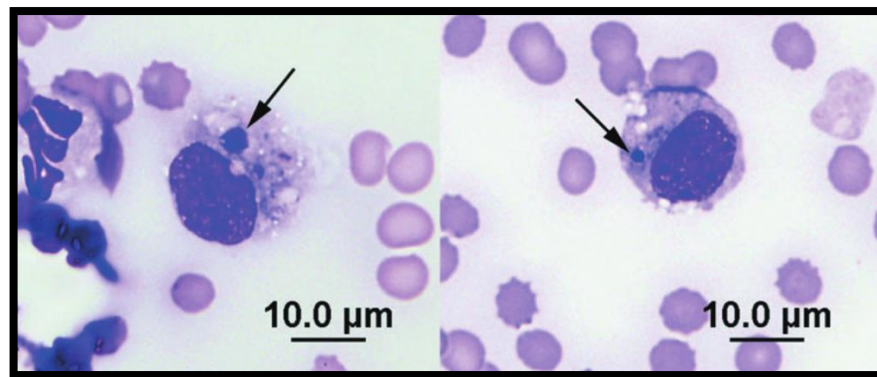


Fig. 4 Mórulas de *Ehrlichia spp.* (flechas) en células de sangre periférica, con morfología variable. Teñidos con Romanowsky (Allison y Little, 2013).

2.8.4 Biología molecular

Recientemente se han empleado herramientas moleculares como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), la cual se ha convertido en la prueba más sensible y específica como método de diagnóstico, aunque esta técnica no distingue entre una infección aguda y un estado de portador. Se han descrito la elección de diferentes genes en el género *Ehrlichia spp.* para la amplificación por la técnica de PCR como el *16S*, *GroESL*, *msp2*, *msp4*, *dsb*, *glta* (citrato sintetasa) (Allison y Little, 2013) y *gp36* (Almazán *et al.*, 2016).

Los ensayos de PCR han contribuido considerablemente para poder entender los agentes anaplasmales, en *Ehrlichia canis* ha permitido una detección directa de un bajo número de organismos en hospederos infectados de manera natural y artificial (Fenollar, 2004; Sparagano *et al.*, 1999).

2.9 Tratamiento

El tratamiento de la infección por *E. canis* consiste en agentes antibacterianos que incluyen tetraciclinas y cloranfenicol, como se puede apreciar en el **cuadro1**. Generalmente los tratamientos tempranos en etapas agudas son más favorables y por el contrario en los caninos en etapas crónicas no responden al tratamiento por los cambios multisistémicos y la severa mielosupresión (Green, 2015).

Cuadro 1 Se muestran los diferentes antimicrobianos usados para el tratamiento en caninos por la infección de *Ehrlichia canis*.

Droga	Dosis (mg/kg)	Administración	Intervalo (horas)	Duración (días)
Doxiciclina	5 a 10	VO (IV)	24	28 (rifamicina-crónicos)
Minociclina	10	VO	12	28
Tetraciclina	22	VO	8	28
Oxitetraciclinas	10	IV	8	28
cloranfenicol	50	VO (IV,SC)	8	28

VO (Vía Oral), IV (Intravenoso), SC (subcutáneo).

2.10 Prevención

Aunque la vacunación es una herramienta de control potencialmente importante, existen problemas inherentes en la utilización de vacunas que son inefectivas contra organismos que pueden evadir células involucradas en la respuesta inmune del hospedero y que adicionalmente estas bacterias tienen una gran variabilidad generando diferentes especies o cepas. Además, se conoce relativamente poco de los aspectos involucrados en una respuesta inmune protectora contra estos agentes en caninos, y tales respuestas inmunes endógenas pueden ser

suprimidas por factores solubles derivados de las garrapatas. A pesar de esto, las vacunas producidas comercialmente están disponibles para babesiosis canina y borreliosis (Birtles *et al.*, 2016).

Aunque no están disponibles comercialmente, también se han evaluado vacunas experimentales para la ehrlichiosis monocítica canina. Los extractos de antígeno de *E. canis* cultivados en células y administrados con adyuvante, indujeron inmunidad mediada por anticuerpos, pero no fue protectora, mientras que una vacuna basada en organismos de *E. canis* completos e inactivados pudo proteger a los perros del desafío experimental (Harrus *et al.*, 1999).

2.11 Salud pública

En 1996 se reportó la primera infección y el aislamiento de una cepa de *E. canis* de una persona infectada de manera crónica en Lara, Venezuela. En USA había casos sospechosos de ehrlichiosis por *E. canis*, sin embargo, hasta la identificación de *E. chaffeensis* la causa era desconocida. *E. chaffeensis* fue aislada de un soldado de Fort Chaffee, Arkansas y reconocida como el agente causal de una nueva enfermedad, más tarde descrita como ehrlichiosis monocítica humana (HME) debido a su tropismo por monocitos (Stephens 2005). Por esta razón se ha sugerido que la cepa venezolana humana es una variante o una subespecie de *E. canis*. y está estrechamente relacionada con *Ehrlichia chaffeensis*. Los signos de la EMH se caracterizan por fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, mialgia, anorexia, vómito, pérdida de peso, trombocitopenia, meningitis y encefalitis. De acuerdo con la CDC, 2006 el diagnóstico se basa en: la evidencia serológica de IgG con la prueba de IFI, ensayos de PCR, inmunohistoquímica a partir de biopsias y aislamiento. El tratamiento es a base de doxiciclina vía oral, dos veces al día por 14 días (Pérez *et al.*, 2006., Gaff y Sonenshine, 2014).

3. Fiebre Maculosa de las Montañas Rocosas (FMMR)

3.1 Antecedentes

En algunos Estados de la República Mexicana como Sinaloa, Nuevo León y Coahuila desde 1985 han reportado año tras año la presencia de tifo endémico o murino y fiebre manchada (Mercado, 2010).

En 2009 se detectó en el municipio de Mexicali, Baja California la presencia de la enfermedad de FMMR provocada por *Rickettsia rickettsii* y *Rickettsia prowazekii*, involucrando como vector a la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Bustamante y Pon, 2010a).

3.2 Etiología

La familia *Rickettsiaceae* puede mantenerse en la naturaleza a través de un ciclo que involucra reservorios en mamíferos y vectores artrópodos. Una característica general de las *rickettsias* es que los mamíferos y los artrópodos son hospederos naturales (Mahajan, 2012). Las bacterias del orden *Rickettsiales* se describieron por primera vez como microorganismos bacilares cortos, Gram negativos que retienen fucsina básica cuando se tiñen con el método de Giménez (**figura 5**), aunque también se pueden utilizar otras tinciones como Wright, Giemsa, Machiavello y Castañeda (Giménez, 1964; Treadwell *et al.*, 2000). Las *Rickettsias* son parásitos intracelulares estrictos que requieren células huésped para replicarse. Estas bacterias se encuentran exclusivamente de forma intracelular, aunque no dentro de una vacuola (Heinzen *et al.*, 1993; Teyseire *et al.*, 1995; Teyseire *et al.*, 1992). Las *Rickettsias* pueden observarse en los núcleos de las células infectadas, tal vez porque pueden moverse dentro de la célula por medio de la polimerización de la actina (Burgdorfer *et al.*, 1968; Heinzen *et al.*, 1993; Teyseire *et al.*, 1992).

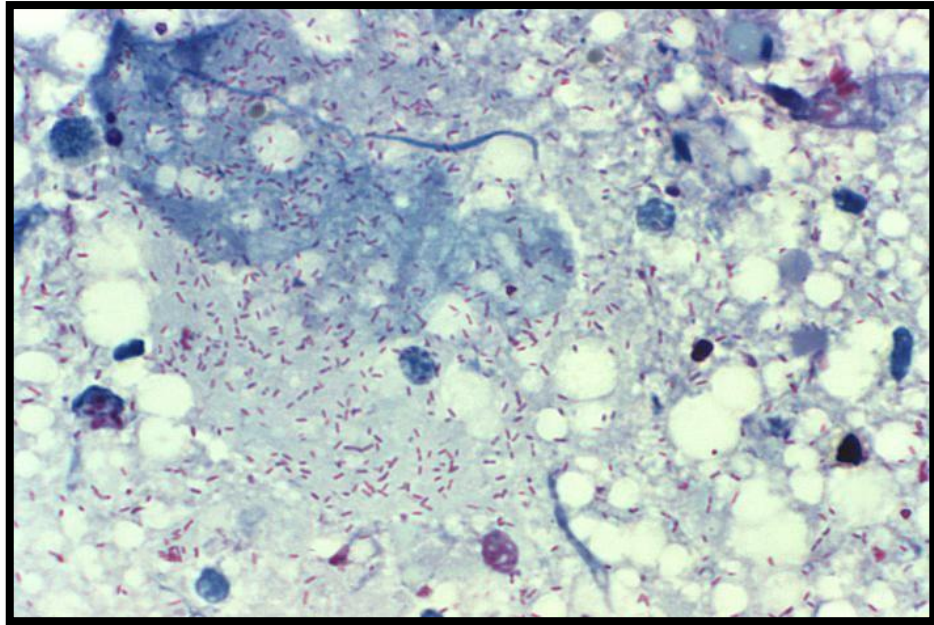


Fig. 5 Microfotografía con la tinción de Giménez del saco vitelino, revelando la presencia de las bacterias *Rickettsia rickettsii* (fuente: https://media.eol.org/content/2009/11/25/03/84915_orig.jpg. fecha de consulta 20/06/2018).

El citosol de estas bacterias es rico en nutrientes como aminoácidos y nucleótidos, esto ha permitido a las *Rickettsias* deshacerse de genes que codifican enzimas para su metabolismo, esta característica es probablemente la razón por la cual no crecen en medios de cultivo convencionales. Las especies de *Rickettsia* contienen al menos 5 autotransportadores que son proteínas con tres dominios, las cuales pueden mediar el transporte a través de la membrana celular al insertarse por la membrana externa hasta llegar a la pared celular. Entre los autotransportadores la proteína de membrana externa (OmpA) está presente solo en *Rickettsias* incluidas en el grupo de fiebre maculosa y OmpB está presente en todas las especies de *Rickettsias* (Walker, 2007).

3.3 Genoma de *R. rickettsii*

Las *Rickettsias* poseen ribosomas 70 S y ambos ácidos nucleicos ADN y ARN (Barba, 2009), el tamaño del genoma de las *Rickettsias* (1.0 a 1.4 mega pares de bases (mpb) para la mayoría de las *Rickettsias*) es cuatro veces más pequeño que el genoma de bacterias entéricas (4.8 mpb para *E. coli*) y de vida libre. El ADN consiste en un cromosoma circular simple (Andersson *et al.*, 1998; McLeod *et al.*, 2004; Roux *et al.*, 1997).

El primer gen empleado en los análisis filogenéticos fue el *16S ARNr*. Su uso permitió un gran avance para los estudios filogenéticos y taxonómicos dentro de este género. Gracias a estos estudios pudieron ser reclasificados diferentes géneros de bacterias ubicados en el orden Rickettsiales como *Coxiella*, *Eperythrozoon*, *Haemobartonella*, *Bartonella*, *Rochalimaea* y *Grahamella*, en otros órdenes, familias e incluso clases (Fouernier, 2009; Ereemeeva, 2012).

Debido a las limitaciones del gen *16S ARN* para hacer una diferenciación dentro del género, comenzaron a emplearse otros genes entre los que se incluyen, *gltA*, que codifica para la enzima citrato sintetasa y los genes de la familia de autotransportadores *sca*: *ompA*, *ompB*, *sca4*, *sca1* y *sca2* (Fouernier, 2009).

3.4 Vector

La garrapata café del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) parece ser el vector primario de *Rickettsia rickettsii*, aunque los géneros *Dermacentor* y *Amblyomma americanum* también son vectores involucrados. *Rhipicephalus sanguineus* y *Amblyomma americanum* son de las garrapatas más distribuidas en todo el territorio mexicano (Ereemeeva *et al.*, 2011; NOM-032-SSA2-2010; Shaw *et al.*, 2001; La Scola *et al.*, 1997).

La infección causada por *Rickettsia rickettsii* en las garrapatas, es sistémica, sin daño aparente a la garrapata hospedera, infectando y multiplicándose en casi todos los órganos, en las células epiteliales del estómago superior, las glándulas salivales y también se encuentra en la hemolinfa del ectoparásito, los machos lo

transmiten mediante fluidos corporales o espermatozoides durante el periodo de reproducción (da Silva Costa *et al.*, 2011).

El microorganismo puede ser transmitido por las garrapatas desde las formas inmaduras a las adultas (transmisión transestadial) y de una garrapata a su descendencia cuando los ovarios y los huevos de la garrapata son infectados (transmisión transovárica) y además, puede ocurrir transmisión horizontal por medio de un mamífero infectado que desarrolle una rickettsemia de suficiente magnitud como para infectar otras garrapatas. La garrapata infectada lleva la bacteria durante toda su vida, manteniendo el microorganismo a través de muchas generaciones de garrapatas, transmitiendo al agente por medio de la saliva mientras se alimenta de la sangre (Anderson y Magnarelli, 2008; Barba, 2009; da Silva Costa *et al.*, 2011; Kaufman, 2010).

3.5 Patogenia

La vía primaria de transmisión de *Rickettsia rickettsii* a hospederos vertebrados susceptibles es a través de la saliva de garrapatas de la familia *Ixodidae* durante el proceso de alimentación (Dantas-Torres, 2007). Una vez que la garrapata asciende al hospedero e inicia el proceso de alimentación requiere un período mínimo de 4 a 6 horas para iniciar la transmisión efectiva de la bacteria, aunque para que sea realmente eficaz deberá prolongarse por 22 a 24 horas (Moore, 1911; Thorner, 1998).

El más importante efecto fisiopatológico es el incremento de la permeabilidad vascular con consecuente edema, disminución del volumen sanguíneo, hipoalbuminemia y disminución de la presión osmótica e hipotensión. Las células endoteliales infectadas generan las erupciones maculares-papulares. La lesión vascular y posterior respuesta linfo-histiocítica contribuyen a la diseminación de las *Rickettsias* generando neumonía y miocarditis intersticial, nódulos gliales perivasculares en SNC, lesiones vasculares en piel, daño gastrointestinal, y de tejidos como páncreas, hígado, músculo esquelético y riñones (**figura 6**). La

disminución en el número de plaquetas se presenta a nivel local (Moore, 1911; Thorner, 1998).

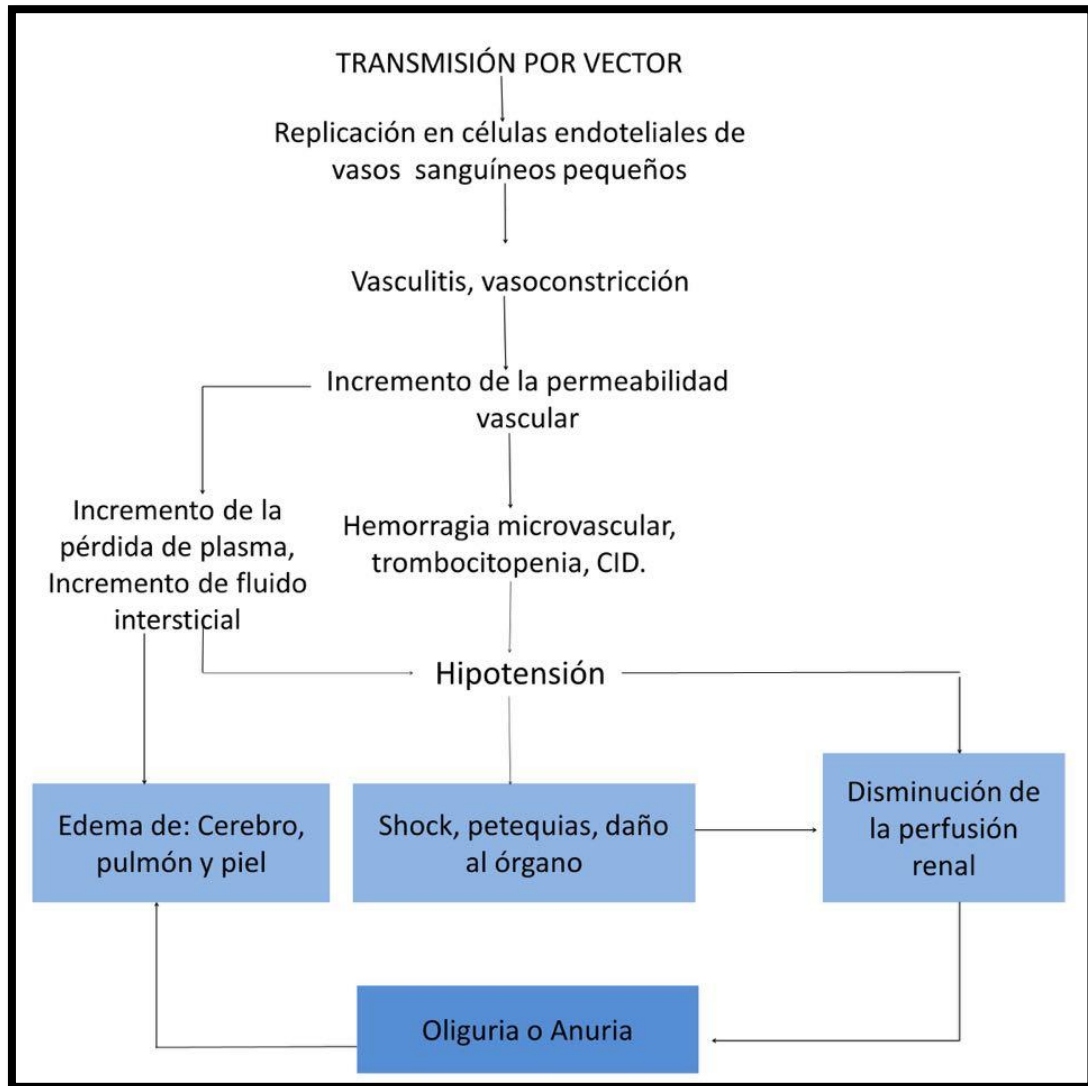


Fig. 6 Patogenia de la infección con *R. rickettsii* en perros. CID (Coagulación Intravascular Diseminada). (Adaptada de Green, 2015).

Las bacterias se unen al receptor de la célula huésped Ku70 por medio de la proteína de superficie más abundante OmpB (Martínez *et al.*, 2005). Las *Rickettsias* del grupo de la fiebre manchada también usan OmpA como adhesina.

Dando como resultado la fagocitosis de la *Rickettsia* asociada, que ocurre como resultado de un mecanismo de cierre que implica la alteración del citoesqueleto actina en el sitio de entrada. Otra proteína rickettsial, la RickA, expresada en la superficie activa la Arp2/3 e inicia la polimerización de la actina de la célula huésped (Gouin, 2004; Jeng *et al.*, 2004). Los filamentos de actina empujan a la *Rickettsia* hacia la superficie de la célula huésped, donde la membrana de esta célula se deforma hacia afuera y se invagina en la célula adyacente. La ruptura de ambas membranas celulares permite que la *Rickettsia* ingrese a la célula adyacente sin estar expuesta al entorno extracelular. Algunas *Rickettsias* salen por la superficie luminal de los vasos sanguíneos hacia el torrente circulatorio como se muestra en la **figura 7** (Walker, 2007).

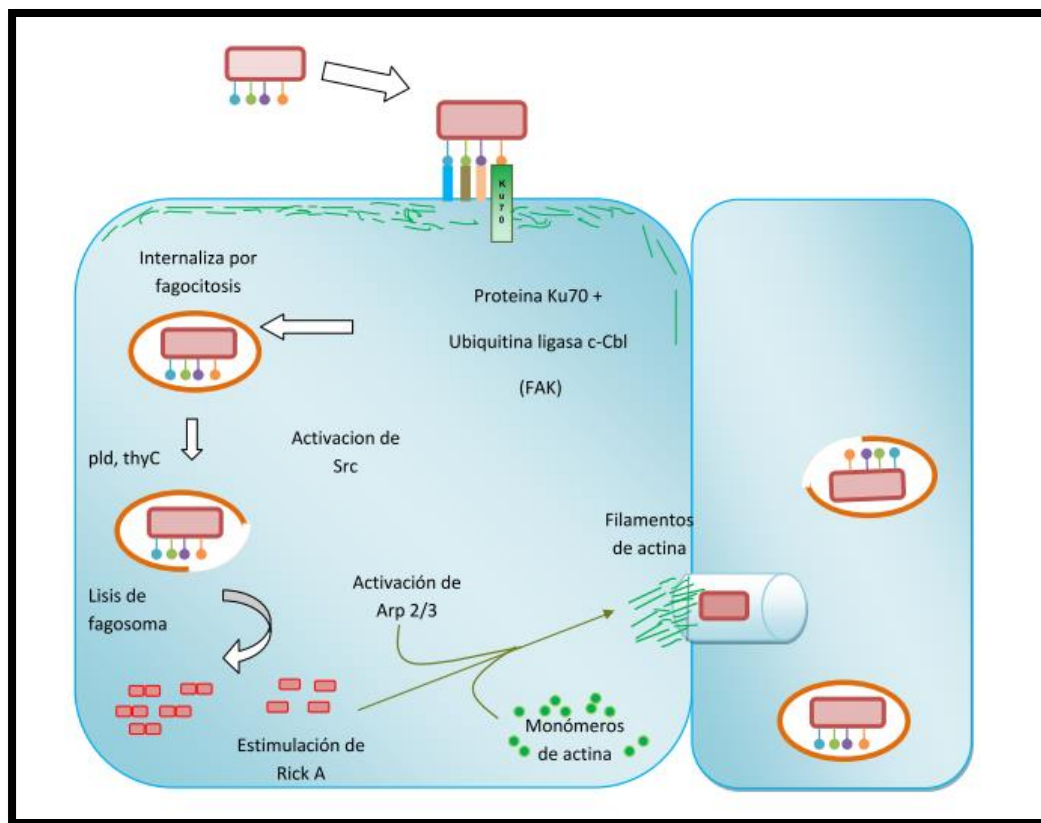


Fig. 7 Infección de la célula por *Rickettsia* y señalización celular (Adaptado de Mansueto *et al.*, 2012; Riley *et al.*, 2010; Walker, 2007; Walker y Ismail, 2008).

Dentro de la célula las bacterias deben aprovechar los nutrientes para poder crecer y evitar la fusión fagolisosomal, si se internalizan las *Rickettsias* deben escapar del fagosoma (Whitworth *et al.*, 2005), para ello las bacterias secretan Fosfolipasa D y hemolisina C, las cuales dañan la membrana fagosomal y así pueden liberarse (Walker, 2007).

La célula diana de las *Rickettsias* es la célula endotelial y su proliferación en el endotelio vascular produce vasculitis (Raoult, 1997). El principal efecto fisiopatológico de las infecciones por *Rickettsias* es una mayor permeabilidad microvascular debido a la ruptura de uniones adherentes entre células endoteliales infectadas, el desarrollo de espacios interendoteliales y la modificación de la forma de células endoteliales a morfología de grandes husos (Valbuena, 2005). El daño a las células endoteliales infectadas con *Rickettsias* se relaciona con el estrés oxidativo, que generan daño peroxidativo de lípidos a las membranas de las células huésped (Rydkina *et al.*, 2004). El daño a la célula endotelial activa el factor nuclear $K\beta$, el cual inhibe la apoptosis y media la producción de citocinas proinflamatorias (Joshi *et al.*, 2004).

El endotelio infectado con *Rickettsias* produce IL-6, IL-8 y la proteína quimiotáctica de monocitos 1. El retraso de la muerte de las células endoteliales permite un mayor crecimiento rickettsial a nivel intracelular (Walker, 2007).

Aunque se sabe que el consumo de plaquetas es la causa primaria de la trombocitopenia en los casos clínicos, también se ha logrado identificar anticuerpos anti-plaquetarios en perros infectados (Grindem *et al.*, 1999).

3.6 Respuesta inmune

La respuesta inmune del hospedero contra la infección por bacterias tiene mecanismos diversos, como la activación del control bactericida de las células endoteliales por la infección intracelular y el papel de la autofagia en la muerte por *Rickettsias* mediada por citoquinas (Valbuena, 2002).

En infecciones tempranas las células NK se activan en asociación con el IFN- γ e inhiben el crecimiento de las bacterias, además los linfocitos T citotóxicos CD8+, eliminan las células endoteliales infectadas, produciendo apoptosis por un mecanismo mediado por perforinas. También se producen anticuerpos contra las proteínas OmpA y OmpB, pero no en contra de los lipopolisacáridos de la membrana externa de las *Rickettsias* que son los protectivos en las reinfecciones (Feng *et al.*, 2004; Feng y Walker, 2004).

Las células T CD4+ y CD8+ contribuyen a la inmunidad protectora, y la localización de linfocitos y macrófagos en los focos de infección en la microcirculación, se asocia con la eliminación de *Rickettsias*. Se ha documentado que las células T CD4+ y CD8+ perivasculares, los macrófagos y las células dendríticas son las fuentes de citocinas que se activan por la rickettsiosis endoteliales (Valbuena, 2002).

3.7 Signos clínicos

La garrapata cuando transmite *Rickettsia rickettsii* y tras un periodo de incubación que oscila entre 2 y 14 días, ocasiona un cuadro agudo inespecífico en su comienzo, que si no es diagnosticado y tratado oportunamente puede ser fatal (CDC, 2006; Chen, 2008).

En su mayoría, las infecciones en perros son subclínicas y en muchas ocasiones hay altas tasas de seropositividad de animales sanos en zonas endémicas (Milagres, 2010), los caninos infectados pueden presentar fiebre, letargia, vómito y anorexia, y a medida que la enfermedad progresa otros signos como lesiones oculares, alteraciones en la coagulación (trombocitopenia), artralgias, orquitis y signos neurológicos pueden ser observados (Nicholson, 2010; Ober *et al.*, 2004; Mikszewski, 2005).

3.8 Diagnóstico

3.8.1 Cultivo

Históricamente varias *Rickettsias spp* han sido aisladas a través de la inoculación en animales de laboratorio como cuyes, ratas, ratones o embrión de pollo, en la actualidad, las estrategias son empleando cultivo celular de fibroblastos de pulmón humano en viales de Shell lo cual implica un sistema de microcultivo y centrifugación para mejorar la adherencia de las *Rickettsias* a las células, en lugar de cajas de cultivo. Las líneas celulares más utilizadas son 14pf (fibroblastos de rata), L929 (tejido conectivo de ratón) y HMEC-1(Célula Endotelial Humana) (Allison y Little, 2013).

3.8.2 Serología

Las pruebas serológicas y la biopsia de piel siguen siendo el mejor medio para confirmar un diagnóstico de FMRR. Los ensayos de anticuerpos inmunofluorescentes se consideran las mejores alternativas diagnósticas serológicas. La aglutinación con látex y los ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) también son técnicas disponibles. La mayoría de los ensayos comerciales identifican IgM e IgG (Chapman *et al.*, 2006). Los anticuerpos contra *R. parkeri* pueden tener reactividad cruzada en los ensayos de *R. rickettsii* (Raoult *et al.*, 2005).

La tinción de inmunohistoquímica es 100% específica y aproximadamente tiene un 70% de sensibilidad (Walker, 1995).

3.8.3 Biología molecular

Se han desarrollado ensayos moleculares para la detección de *Rickettsia spp.* en sangre y otros tejidos como piel. Sin embargo, se ha demostrado que la utilidad en muestras de sangre periférica de caninos es bastante variable, particularmente para *R. rickettsii*, presumiblemente debido a un número bajo de organismos circulantes (Allison y Little, 2013; CDC, 2012).

3.9 Tratamiento

Los antimicrobianos usados para la FMMR se conocen como riketsiostáticos, la doxiciclina y cloranfenicol (o derivados del mismo) son los fármacos de elección y deben administrarse por lo menos durante 7 días. Los casos de muerte por FMMR se asocian al diagnóstico tardío de la infección (Green, 2015; Dantas-Torres, 2007).

3.10 Prevención

No hay vacunas disponibles para el uso en caninos o en personas. Se han utilizado a nivel experimental vacunas recombinantes derivadas de la proteína de membrana externa de *R. rickettsii* o *R. conorii* mostrando inmunoprotección en roedores (Green, 2015). Hay que evitar zonas endémicas donde está presente el vector, así como el uso de repelentes (Dantas-Torres, 2007).

3.11 Salud pública

La tríada clínica clásica de la fiebre manchada de las montañas rocosas en humanos consiste en fiebre, cefalea y erupción cutánea, los cuales a menudo aparecen súbitamente. El exantema (rash) aparece entre el tercero y el sexto día después del inicio de los síntomas. La erupción inicialmente es eritematosa, posteriormente puede volverse como una lesión macular de 1-5mm y representa el foco de la infección vascular acompañada de vasodilatación. La erupción es el signo más característico de la enfermedad; se presenta en más de 80% de los casos y se inicia por las muñecas y los tobillos. Al término de la primera semana pueden aparecer síntomas nerviosos tales como agitación, insomnio, delirio y coma. En la segunda semana de la enfermedad se pueden presentar complicaciones circulatorias y pulmonares (Hun-Opfer, 2008; Pickering, 2000).

4. JUSTIFICACIÓN

En la ciudad de Chihuahua, México no se ha generado información respecto a la posible infección en perros con *Ehrlichia canis* y/o *Rickettsia rickettsii*, aún con la evidencia del vector (*Rhipicephalus sanguineus*) en la región, por lo que una estrategia de diagnóstico de tipo molecular como PCR punto final, puede ser adecuada para reconocer la presencia de este tipo de infecciones en caninos.

5. HIPÓTESIS

Si los caninos que habitan la ciudad de Chihuahua se encuentran parasitados por la garrapata café del perro (*Rhipicephalus sanguineus*), entonces, pueden estar infectados por bacterias del género *Ehrlichia spp.* y *Rickettsia spp.* y es posible detectarlas e identificarlas por PCR-secuenciación.

6. OBJETIVOS

- **General**

- Identificar a *Ehrlichia canis* y/o *Rickettsia rickettsii* presentes en caninos infectados que habitan en la ciudad de Chihuahua, México, mediante la técnica de PCR punto final-secuenciación.

- **Particulares**

- Diseñar iniciadores para la técnica de PCR con la finalidad de amplificar ADN bacteriano a partir de leucocitos de sangre periférica infectados.
- Estandarizar las condiciones de la PCR para la detección de *Ehrlichia canis* y/o *Rickettsia rickettsii* que permitan generar productos de amplificación secuenciables con lo que se confirmará el género y la especie.
- Establecer la frecuencia de la infección por bacterias *Ehrlichia canis* y/o *Rickettsia rickettsii* detectadas en poblaciones caninas de la ciudad de Chihuahua, México.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Población de estudio

El grupo de estudio se conformó por una población de 123 caninos de diferentes edades, razas y sexo de tres regiones de la ciudad de Chihuahua que en estudios previos (Márquez, 2012) identificaron la presencia del vector *Rhipicephalus sanguineus*.

En la **figura 8** se detalla el área de estudio, identificando las colonias de la ciudad de Chihuahua en donde fueron recolectadas las muestras.

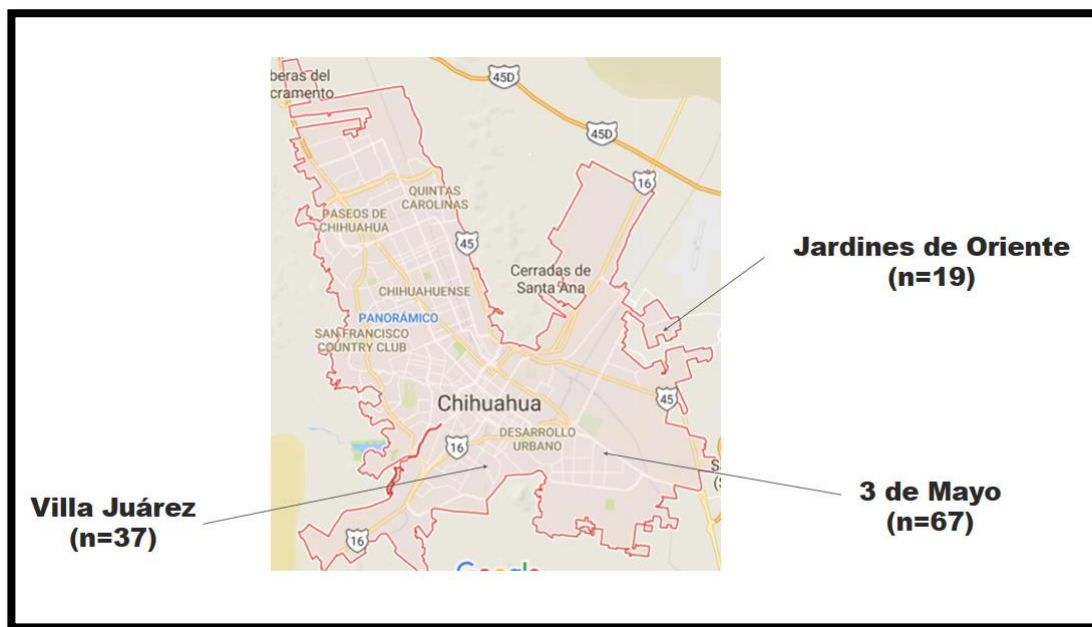


Fig. 8 Colonias en la ciudad de Chihuahua donde se realizó el muestreo en caninos apoyado por el centro de control.

7.2 Muestras sanguíneas

De cada canino se obtuvo una muestra de sangre en tubos con heparina (BD Vacutainer®, México) y aguja calibre 21 (BD, México) por punción de la vena cefálica o safena. Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm por 15 minutos para separar la fracción líquida (plasma) y la capa blanca fue obtenida mediante el uso de soluciones de lisis (Gorodezky et al., 2009) (anexo 1), elaboradas en el laboratorio de “Virología, Genética y Biología Molecular” para obtener los leucocitos de sangre periférica (LSP) (anexo 1).

7.3 Extracción de ADN

A partir de los LSP se realizó la extracción de ADN con el uso de un kit comercial (FavorPrep™ Tissue DNA Extraction Mini Kit, FavorGen® Biotech Corp., Pingtung, Taiwán), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN obtenido se cuantificó mediante la lectura de la absorbancia a 260-280 nm en un NanoDrop Lite (Thermo Scientific, USA) y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

7.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para el diseño de los iniciadores que se emplearon en la PCR se consideraron secuencias disponibles en la base de datos del GenBank de las regiones genéticas *gp36* y *ompA*. Se utilizaron los programas bioinformáticos de BioEdit (BioEdit version 5.0.6 Copyright ©1997-2001) y Primer3 Input versión 4.0.0 (https://primer3plus.com/primer3web/primer3web_input.htm) para el diseño de los iniciadores.

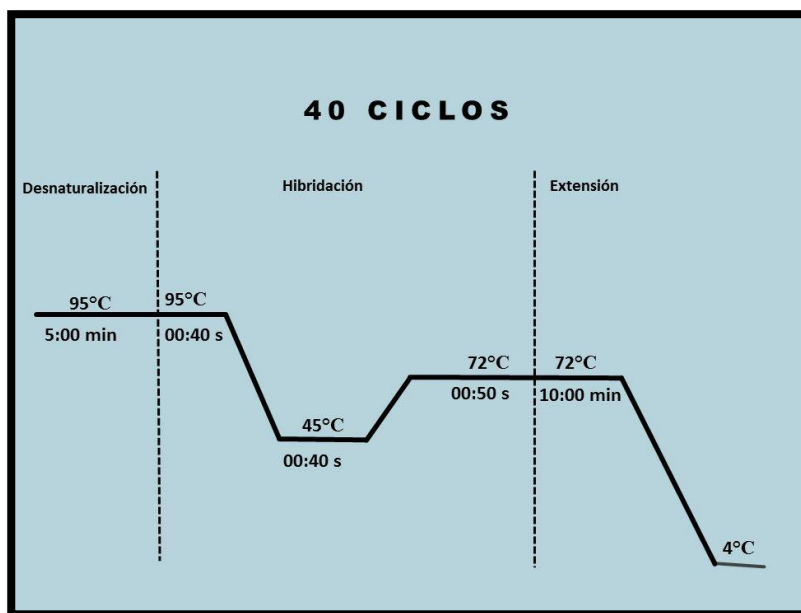
7.4.1. PCR gen *gp36* de *E. canis*

Condiciones de amplificación y concentraciones de reactivos de la primera ronda de la PCR para amplificar un fragmento del gen *gp36* de *E. canis* (**cuadro 2 y figura 9**).

Cuadro 2 Reactivos de la mezcla de reacción de la PCR-gp36 (primera ronda) para identificar *E. canis*.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN INICIAL	VOLUMEN POR REACCIÓN (µl)
Agua gbm	N/A	9.15
Buffer 10x con 1.5 Cl ₂ Mg	1x	2.0
DNTP´s	225µM	0.45
Iniciador Fw1 gp36	600nM	1.2
Iniciador Rv1 gp36	600nM	1.2
Taq	5U/µl	1
ADN	500ng	5
Total		20.0

gbm: grado biología molecular, Cl₂Mg: cloruro de magnesio, ng: nanogramos, nM: milimolar, nM: nanomolar, µM: micromolar, U/µl: unidades por microlitro, DNTP´s: mezcla de deoxinucleotidos, Fw: forward, Rv: reverse, N/A: no aplica.



° C: grados Celsius.

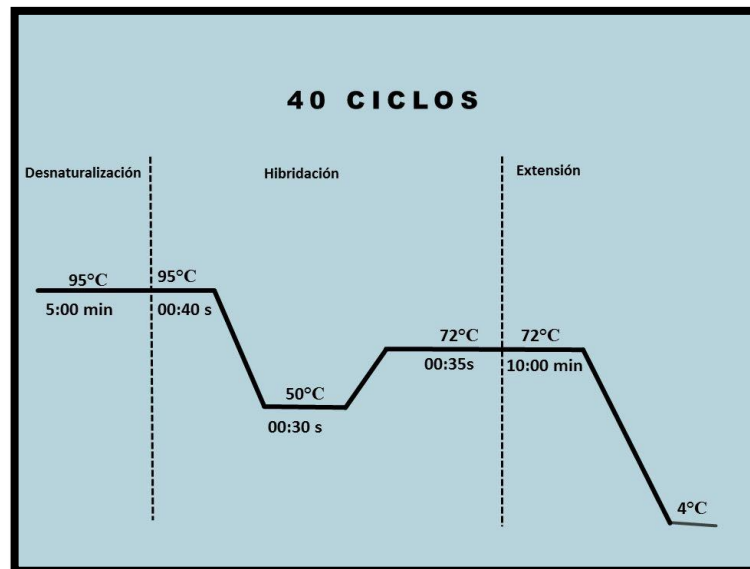
Fig. 9 Condiciones de amplificación de la PCR-gp36 (primera ronda) para identificar *E. canis*.

Condiciones de amplificación y concentraciones de reactivos de la PCR anidada para amplificar un fragmento del gen *gp36* de *E. canis*, se describe en el **cuadro 3** y **figura 10**.

Cuadro 3. Mezcla de reacción para la PCR-*gp36* anidada de *E. canis*.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN INICIAL	VOLUMEN POR REACCIÓN (µl)
Agua gbm	N/A	16.73
Buffer 10x con 1.5 Cl ₂ Mg	1x	3.0
DNTP´s	225µM	0.68
Iniciador Fw2 <i>gp36</i>	600nM	1.8
Iniciador Rv2 <i>gp36</i>	600nM	1.8
Taq	5U/µl	1
ADN producto 1ª ronda	1:10	5
Total		30.0

gbm: grado biología molecular, Cl₂Mg: cloruro de magnesio, ng: nanogramos, nM: milimolar, nM: nanomolar, µM: micromolar, U/µl: unidades por microlitro, DNTP´s: mezcla de deoxinucleotidos, Fw: forward, Rv: reverse, N/A: no aplica.



° C: grados Celsius.

Fig. 10. Condiciones de amplificación de la PCR *gp36* anidada de *E. canis*.

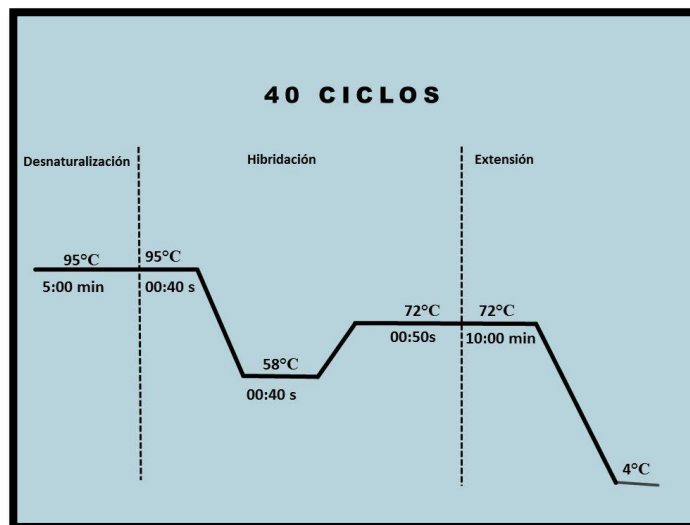
7.4.2. PCR gen ompA de *R. rickettsii*

Condiciones de amplificación y concentraciones de reactivos de la primera ronda de la PCR para amplificar un fragmento del gen *ompA* (**cuadro 4 y figura 11**).

Cuadro 4 Reactivos de la mezcla de reacción de la PCR-*ompA* (primera ronda) para identificar *R. rickettsii*

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN INICIAL	VOLUMEN POR REACCIÓN (μl)
Agua gbm	N/A	9.15
Buffer 10x con 1.5 Cl ₂ Mg	1x	2.0
DNTP's	225μM	0.45
Iniciador Fw1 gp36	800nM	1.2
Iniciador Rv1 gp36	800nM	1.2
Taq	5U/μl	1
ADN	500ng	5
Total		20.0

gbm: grado biología molecular, Cl₂Mg: cloruro de magnesio, ng: nanogramos, nM: milimolar, nM: nanomolar, μM: micromolar, U/μl: unidades por microlitro, DNTP's: mezcla de deoxinucleotidos, Fw: forward, Rv: reverse, N/A: no aplica.



° C: grados Celsius.

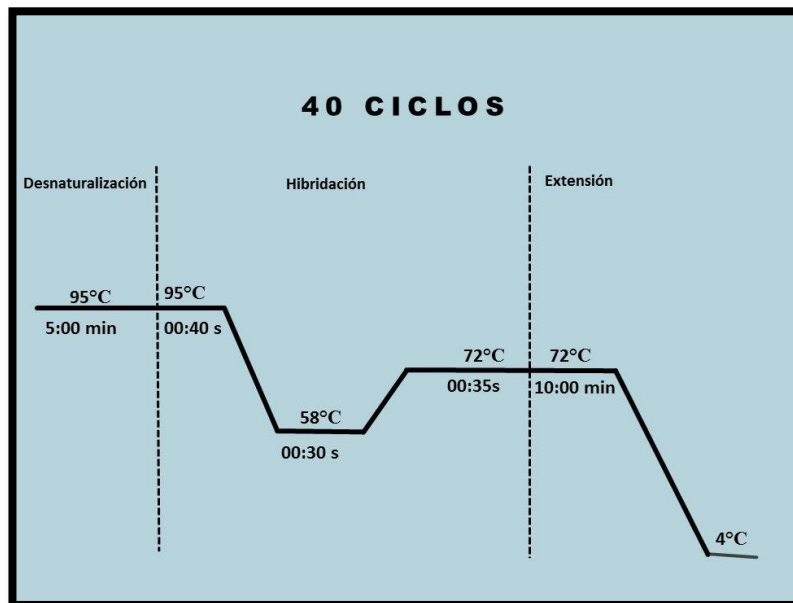
Fig. 11 Condiciones de amplificación de la PCR-*ompA* (primera ronda) para identificar *R. rickettsii*.

Condiciones de amplificación y concentraciones de reactivos de la PCR anidada para amplificar un fragmento del gen *ompA* de *R. rickettsii*, se describe en el **cuadro 5 y figura 12.**

Cuadro 5 Mezcla de reacción para la PCR-*ompA* anidada de *R. rickettsii*.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN INICIAL	VOLUMEN POR REACCIÓN (µl)
Agua gbm	N/A	16.73
Buffer 10x con 1.5 Cl ₂ Mg	1x	3.0
DNTP´s	225µM	0.68
Iniciador Fw1gp36	800nM	1.8
Iniciador Rv1gp36	800nM	1.8
Taq	5U/µl	1
ADN producto 1ª ronda	1/10	5
Total		30.0

gbm: grado biología molecular, Cl₂Mg: cloruro de magnesio, ng: nanogramos, nM: milimolar, nM: nanomolar, µM: micromolar, U/µl: unidades por microlitro, DNTP´s: mezcla de deoxinucleotidos, Fw: forward, Rv: reverse, N/A: no aplica.



° C: grados Celsius.

Fig. 12 Condiciones de amplificación de la PCR *ompA* anidada de *R. rickettsii*.

7.5. Electroforesis

Al finalizar la reacción de PCR el producto se analizó y separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X (anexo 1), conteniendo bromuro de etidio (BIO-RAD, USA) y visualizado en un transiluminador con luz UV (UVP, M-20E, USA). El producto procedente de bandas que se identificaron en el tamaño esperado fueron cortadas.

7.6. Purificación

Las bandas cortadas fueron purificadas con ayuda de un kit comercial FavorPrep GEL/ PCR Purification Mini Kit de Favorgen® Biotech Corp., Pingtung, Taiwán; siguiendo las indicaciones del fabricante.

7.7. Secuenciación, análisis y edición de secuencias

El ADN se secuenció en un equipo para tal fin (modelo 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems®) de 16 capilares en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES-Iztacala, UNAM.

La secuenciación se realizó con base en la cadena antisentido 3'-5' utilizando el iniciador Rvgp36. Las secuencias resultantes posteriormente fueron analizadas empleando el programa bioinformático CHROMAS®. Un análisis comparativo de similitud e identidad entre las secuencias de los genes gp36 y ompA se llevó a cabo con el programa BioEdit®.

7.8 Análisis filogenético

Las alineaciones múltiples para los estudios de comparación y filogenéticos se realizaron con el programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool, EUA) y **MEGA® v7.018**.

Los árboles filogenéticos se construyeron con el algoritmo Neighbor-Joining, utilizando el programa **MEGA**® v7.018. Los límites de confianza estadística de la topología de los filogramas se determinaron con ayuda de 1000 bootstraps.

7.9. Análisis estadístico

Usando un modelo lineal generalizado en el programa SPSS (<https://ibm-spss-statistics-base.uptodown.com/windows>) se buscaron diferencias en la detección por PCR entre el sexo, raza y edad de los perros, así como la colonia de procedencia de las muestras, para ello se empleó el modelo logístico binario que se muestra a continuación (Coughling, 1992):

$$P(Y) = \frac{1}{1 + e^{-(b_0 + b_1 x_1)}}$$

Donde:

P: Probabilidad de que ocurra Y (Y= detección de la enfermedad)

e: Logaritmo natural (e= 2.7182818..)

b₀: El intercepto con el eje de las Y

b₁: Línea gradiente

x₁: Predice la probabilidad de Y

8. RESULTADOS

El total de las muestras de caninos colectadas fueron 123, de las cuales 66 fueron hembras y 57 machos.

El grupo muestreado fue clasificado en mestizos y de raza, los cuales el 36.59% correspondían a caninos de raza y 63.41% a caninos mestizos.

Respecto a las edades, se muestrearon 56 caninos menores de un año, 26 de 1 a 3 años, 29 de 3 a 6 años y 12 mayores a 6 años (**figura 13**).

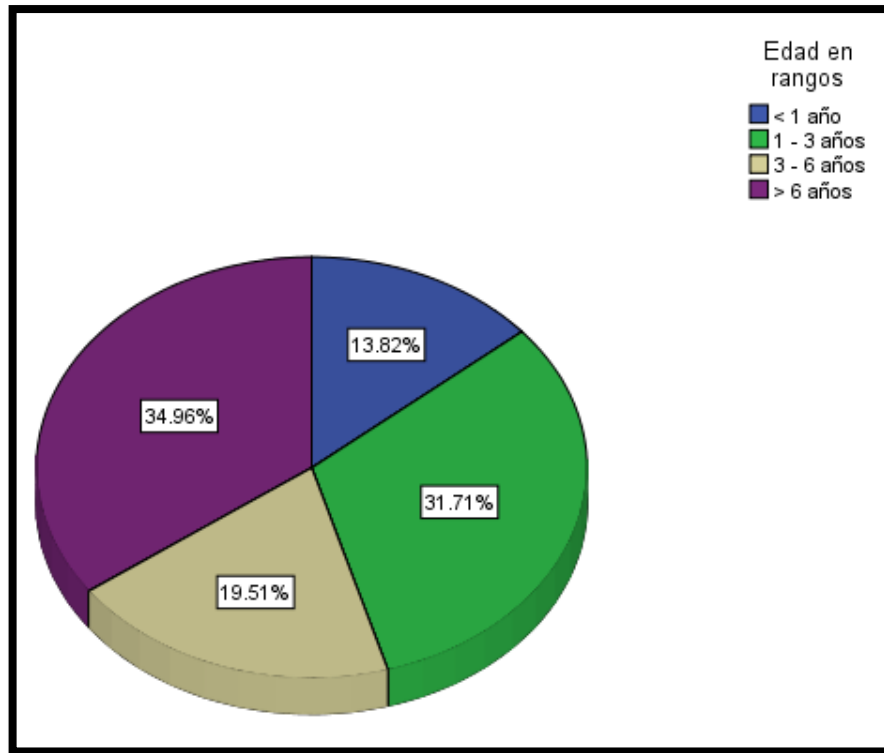


Fig. 13 Edades de los caninos muestreados y expresados en porcentajes, los caninos se dividieron en 4 grupos: menor de 1 año, de 1 a 3 años, de 3 a 6 años y mayores de 6 años.

Las muestras fueron recolectadas de diferentes colonias, las cuales se mencionan a continuación.

Cuadro 6 Colonias de la ciudad de Chihuahua donde se realizó el estudio, se muestra el número de muestras de caninos por colonia.

Colonia	Número de muestras
Jardines de Oriente	19 (15.45%)
3 de Mayo	67 (54.47%)
Villa Juárez	37 (30.08%)
Total	123 (100%)

Los resultados obtenidos en la observación de los frotis de sangre periférica de las muestras de caninos teñidos con Giemsa-Wright (anexo 1) fue la observación de la presencia de una mórula en la muestra 46c (figura 14).

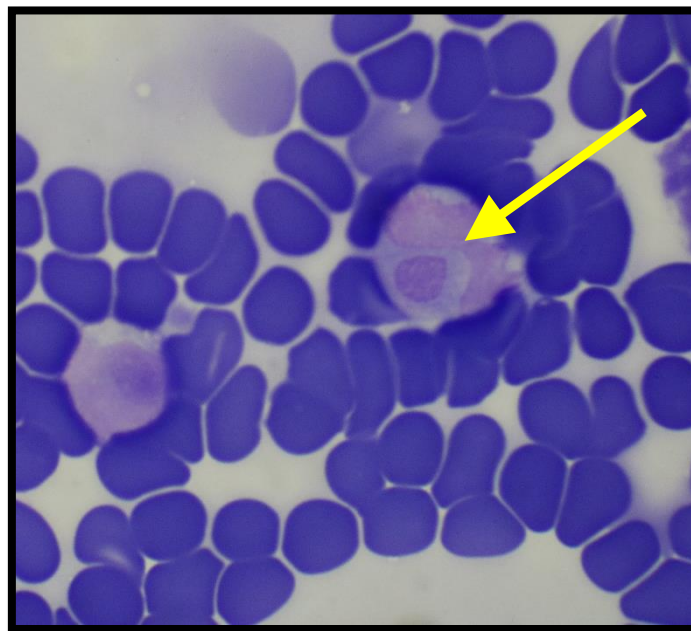


Fig. 14 Se muestra la presencia de una mórula (flecha amarilla) dentro de un neutrófilo.

8.1 Ehrlichia canis

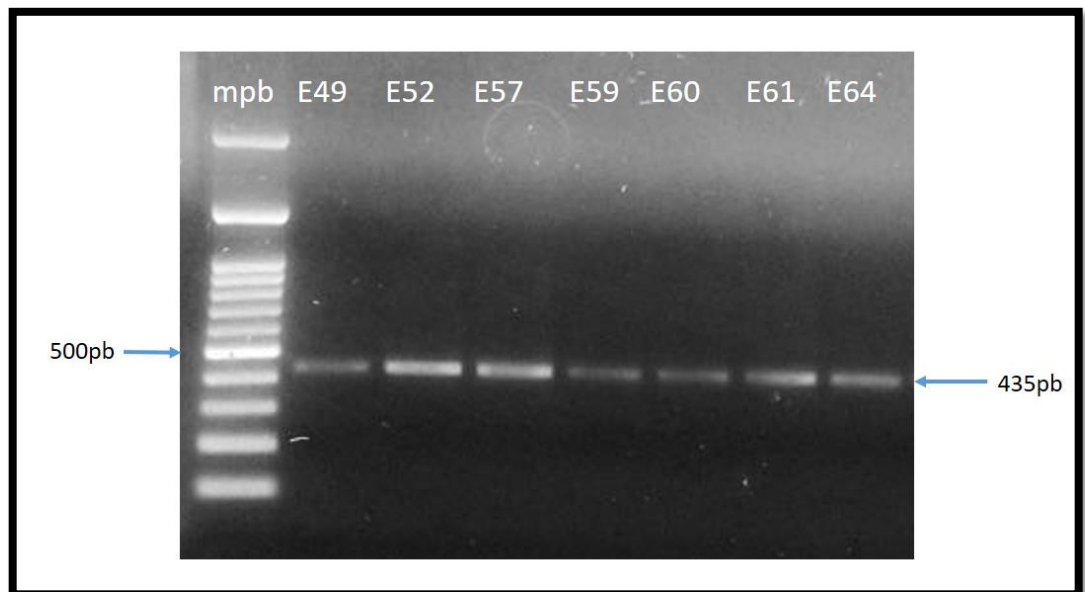
Los iniciadores para la PCR anidada se diseñaron utilizando secuencias disponibles en el GenBank, además de utilizar posibles candidatos de iniciadores previamente ya reportados (**cuadro 7**).

Cuadro 7 Iniciadores utilizados para la amplificación de un fragmento del gen *gp36* de *E. canis* por PCR anidada.

Iniciadores	Referencia	Secuencia	Producto de amplificación	Tm (°C)
Fwgp36	Almazán, 2015.	GTATGTTTCTTTTATATCATGGC	748 pb	51.78
Rvgp36	Almazán, 2015.	GGTTATATTTTCAGTTATCAGAAG		50.60
gp36 Fw2	Este estudio	ATGGGTTATTGTATGCTTCATT	435 pb	54.61
gp36 Rv2	Este estudio	AGCAGAAACAGAATCTTCAGTAA		55.88

pb = pares de bases

El producto esperado de una amplificación positiva por PCR anidada para *Ehrlichia canis* fue de 435 pb, con esta técnica se lograron amplicones positivos en 20 de las 123 muestras evaluadas (**figura 15**). La frecuencia de infección por *E. canis* en caninos de Chihuahua detectada por la PCR anidada fue del 16%.



mpb = marcador de pares de bases; amplicones positivos E49, E52, E57, E59, E60, E61 y E64.

Fig. 15 Productos de amplificación por PCR de un fragmento del gen *gp36* de *Ehrlichia canis* separados por electroforesis en un gel de agarosa.

8.1.1. Muestras de caninos positivos por PCR a *E. canis*

Los resultados obtenidos por PCR para *E. canis* se muestran por grupos de estudio (**cuadro 8**). Los resultados positivos por sexo fueron 14.04% en machos y 18.18% en hembras (**figura 16**). Los resultados obtenidos por edad indicaron una menor positividad en caninos por debajo de un año de edad y los de mayor positividad fueron los animales de más de 6 años de edad (**figura 17**). Los resultados obtenidos para las razas definidas y mestizos fue de una ligera mayor positividad para el grupo de razas definidas (**figura 18**). Con respecto a la positividad de la PCR por región, la colonia Villa Juárez fue la que tuvo un menor número de caninos positivos a *E. canis* (**figura 19**).

Cuadro 8. Muestras positivas por PCR anidada que amplificó un fragmento del gen *gp36* de *E. canis* a partir de leucocitos de sangre periférica de caninos.

Identificación	Edad (meses)	Sexo	Raza	PCR positivos	Muestras secuenciadas
25c	24	Macho	Mestizo	+	
28c	4	Hembra	Poodle	+	
33c	36	Hembra	Mestizo	+	
35c	7	Macho	Mestizo	+	
36c	5	Macho	Mestizo	+	
38c	18	Macho	Cocker	+	

44c	108	Hembra	Chihuahueño	+	
49c	48	Hembra	Mestizo	+	
52c	84	Macho	Mestizo	+	+
57c	48	Hembra	Chihuahueño	+	+
59c	36	Hembra	Cocker	+	+
60c	36	Hembra	Chihuahueño	+	
61c	24	Hembra	Mestizo	+	+
64c	84	Macho	Mestizo	+	+
70c	24	Hembra	Mestizo	+	
71c	84	Macho	Mestizo	+	
78c	36	Hembra	Bóxer	+	
79c	5	Macho	Pitbull	+	
82c	24	Hembra	Mestizo	+	
2d	60	Hembra	Bóxer	+	

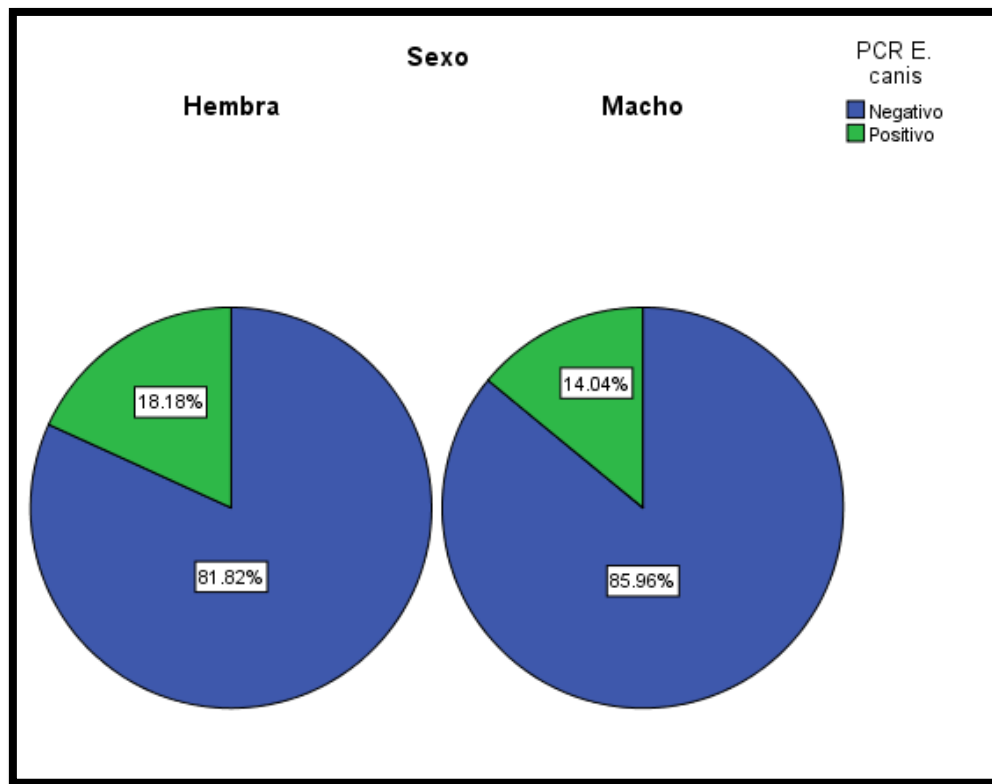


Fig. 16 Resultados de la PCR para la detección de *E. canis* mostrados por sexo.

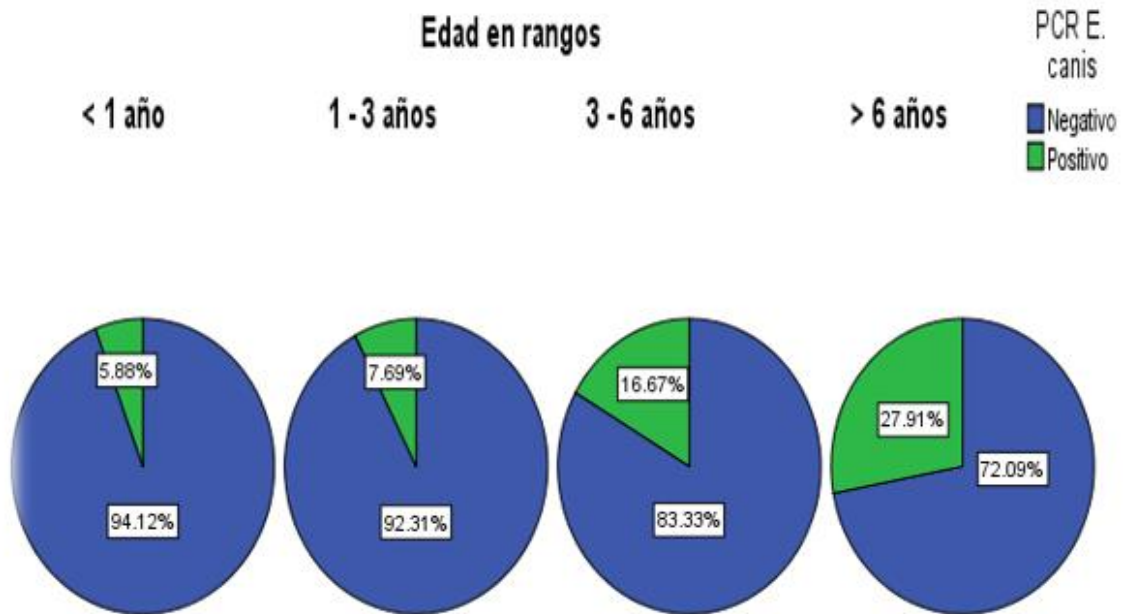


Fig. 17 Resultados de la PCR para la detección de *E. canis* mostrados por edad.



Fig. 18 Resultados de la PCR para la detección de *E. canis* mostrados por raza definida y mestizos.

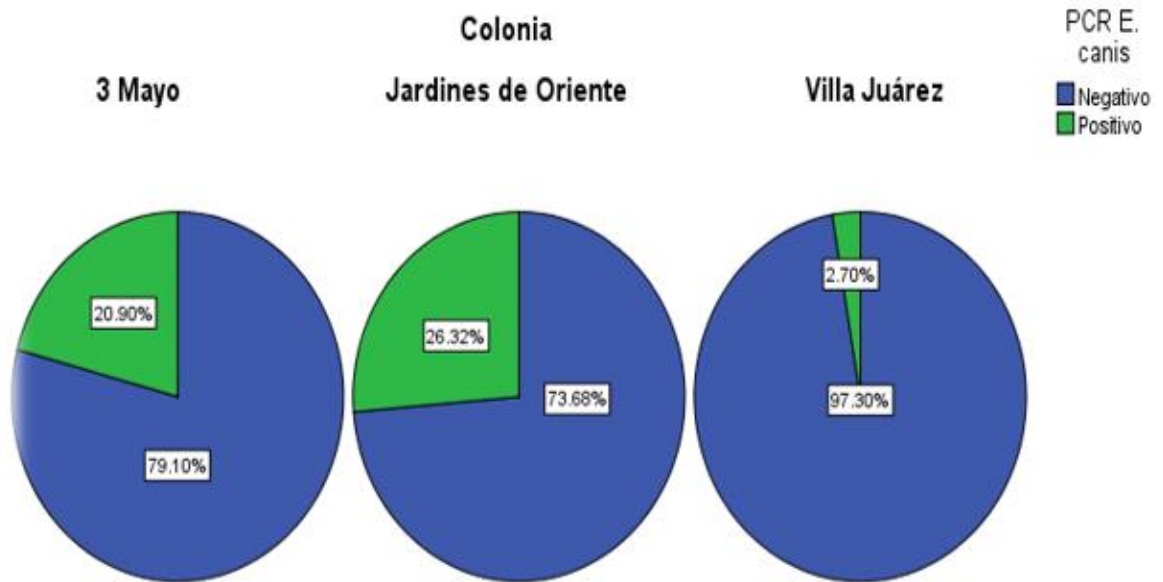
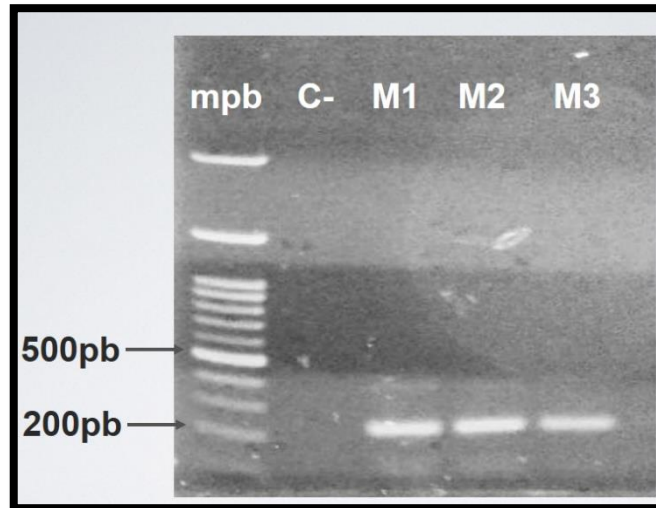


Fig. 19 Resultados de la PCR para la detección de *E. canis* mostrados por colonia de muestreo en la Ciudad de Chihuahua.

8.1.2. PCR del gen constitutivo hipoxantín-guanín fosforribosil transferasa 1 (HPRT1)

Se evaluaron las muestras con resultados negativos a la PCR para *E. canis* con la finalidad de verificar la integridad del ADN utilizado y corroborar su resultado negativo. Se usaron los iniciadores FwHTPR1 (5´-TTG CTG ACC TGC TGG ATT AC-3´) y RvHTPR1 (5´-CTG ACC AAG GAA AGC AAA GT-3´) (Ramos, S.L. 2016), esperando un producto de amplificación de 225 pb. La realización y condiciones de la PCR se muestran en la **figura 20, 21 y cuadro 9**.



mpb: marcador de pares de bases; C (-): control negativo; M1, M2 y M3 muestras de ADN obtenidas de leucocitos de sangre periférica de caninos.

Fig. 20 Se muestran amplicones positivos por la PCR de un fragmento del gen constitutivo *HPRT1* en muestras negativas a la PCR de *E. canis*, separados por electroforesis en geles de agarosa.

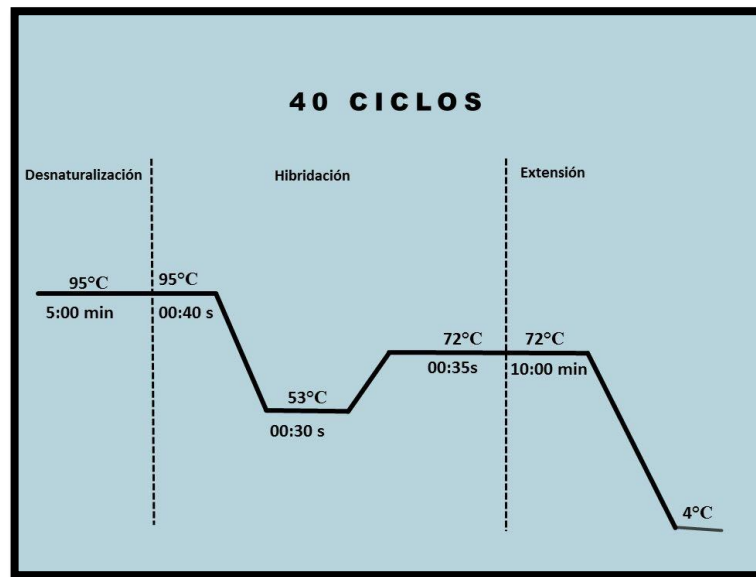
De las 100 muestras procesadas para PCR del gen constitutivo *HPRT1* se encontraron 76 positivas y 24 muestras negativas.

Cuadro 9 Composición de la mezcla de la PCR para la amplificación de un fragmento del gen *HPRT1*.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN INICIAL	VOLUMEN POR REACCIÓN (µl)
Agua gbm	N/A	11.32
Buffer 10x con 1.5 Cl ₂ Mg	1x	3.0
DNTP´s	225µM	0.68
Iniciador FwHTPR1	600nM	1.0
Iniciador RvHTPR1	600nM	1.0
Taq	5U/µl	1.0

ADN	500ng	2
Total		20.0

gbm: grado biología molecular, Cl₂Mg: cloruro de magnesio, ng: nanogramos, nM: milimolar, nM: nanomolar, μM: micromolar, U/μl: unidades por microlitro, DNTP's: mezcla de deoxinucleotidos, Fw: forward, Rv: reverse, N/A: no aplica.



°C: grados Celsius.

Fig. 21 Condiciones de amplificación de la PCR-HPTR1.

8.1.3. Secuenciación

Para comprobar la especificidad de la PCR de *E. canis* y realizar el análisis filogenético, se enviaron a secuenciar por el método Sanger (**figura 22**) a la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES-Iztacala cinco amplicones positivos purificados de bandas que tuvieron el tamaño esperado.

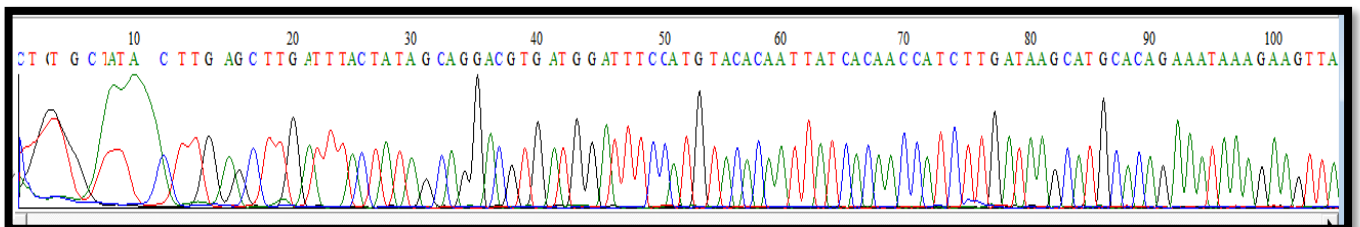


Fig. 22 Se muestra el cromatograma obtenido de una secuencia nucleotídica de *E. canis* por el método Sanger.

El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas posterior a la secuenciación mostró una alta similitud (99%) entre las secuencias de *E. canis* del estudio con secuencias disponibles en el GenBank utilizando el programa BLASTn (figura 23).

Download ▾ GenBank Graphics

Ehrlichia canis isolate 37y97_gp36 immunodominant surface protein gp36 gene, complete cds
 Sequence ID: [KT357369.1](#) Length: 846 Number of Matches: 1

Range 1: 16 to 410 GenBank Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	725 bits(392)	0.0	394/395(99%)	0/395(0%)	Plus/Minus
Query	10	ACTTGAGCTTGATTTACTATAGCAGGACGTGATGGATTTCCATGTACACAATTATCACAA	69		
Sbjct	410	ACTTGAGCTTGATTTACTATAGCAGGACGTGATGGATTTCCATGTACACAATTATCACAA	351		
Query	70	CCATCTTGATAAGCATGCACAGAAATAAAGAAGTTAGGATGGTTATTAACATCTAACTCA	129		
Sbjct	350	CCATCTTGATAAGCATGCACAGAAATAAAGAAGTTAGGATGGTTATTAACATCTAACTCA	291		
Query	130	TGAAAAGGAGCCATTGGATCAATTAAGAAAAGAAACATTCAAACATGATCCTTCATATTA	189		
Sbjct	290	TGAAAAGGAGCCATTGGATCAATTAAGAAAAGAAACATTCAAACATGATCCTTCATATTA	231		
Query	190	AAGTTAAAGTCTTCAGCTTTAGCACCATGTAATCTGATATTACATGGCCATTGTTCTTA	249		
Sbjct	230	AAGTTAAAGTCTTCAGCTTTAGCACCATGTAATCTGATATTACATGGCCATTGTTCTTA	171		
Query	250	AATAAAATATGATAACCATGTTCCAGGATGGTTTTCAATATCAAGTTCTAGATCACCACCT	309		
Sbjct	170	AATAAAATATGATAACCATGTTCCAGGATGGTTTTCAATATCAAGTTCTAGATCACCACCT	111		
Query	310	GAAACACCAAATCTTTCACCTTGATGTATATGAAAATCATGAGCAAAAATCAATGTTTGTG	369		
Sbjct	110	GAAACACCAAATCTTTCACCTTGATGTATATGAAAATCATGAGCAAAAATCAATGTTTGTG	51		
Query	370	ATTTCTGTTGTTAAATGAAGCATACAATAACCCAT	404		
Sbjct	50	ATTTCTGTTGTTAAATGAAGCATACAATAACCCAT	16		

Fig. 23 Resultados de similitud entre una secuencia nucleotídica amplificada del gen *gp36* de *E. canis* obtenida en el presente estudio con las disponibles en el GenBank utilizando BLASTn.

Se realizó la deducción de las secuencias nucleotídicas generadas en el estudio a aminoácidos y se hicieron alineamientos de estas secuencias comparándolas con secuencias de referencia (figura 24).

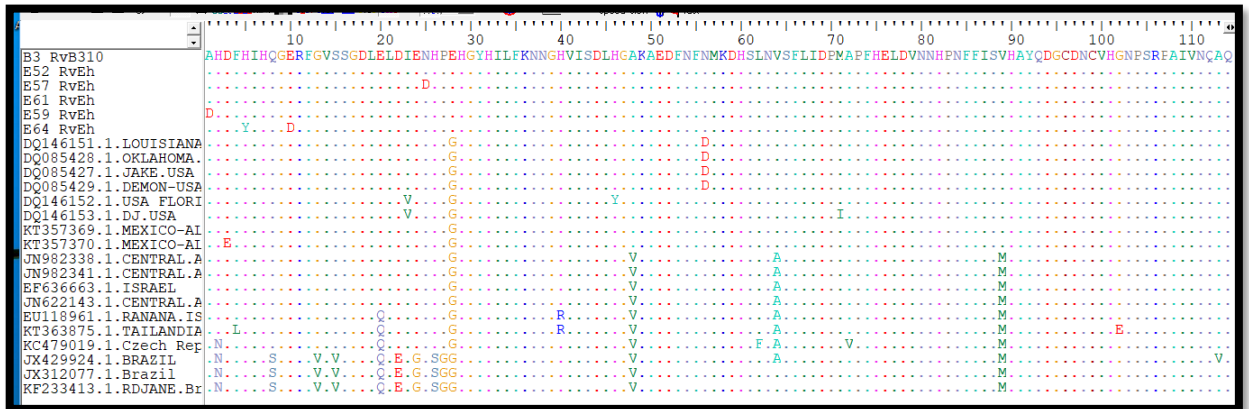


Fig. 24 Alineamiento de aminoácidos de la región genética *gp36* de *E. canis*. Se encontraron cambios en las muestras E52 de un ácido aspártico (D) por una asparagina (N) en la posición 25, en la muestra E59 de un ácido aspártico (D) por una alanina (A) en la posición 1 y en la muestra E64 de una tirosina (Y) y un ácido aspártico (D) en las posiciones 5 (H, Histidina) y 10 (E, glutámico) respectivamente.

8.1.4. Análisis filogenético

Se construyó un árbol filogenético con secuencias nucleotídicas parciales del gen *gp36* de *E. canis* obtenidas en el presente estudio, incluyendo otras secuencias disponibles en el GenBank de México y de otros países. Las secuencias de nucleótidos de *E. canis* derivadas de perros infectados en Chihuahua se asociaron en un mismo grupo (**figura 25**).

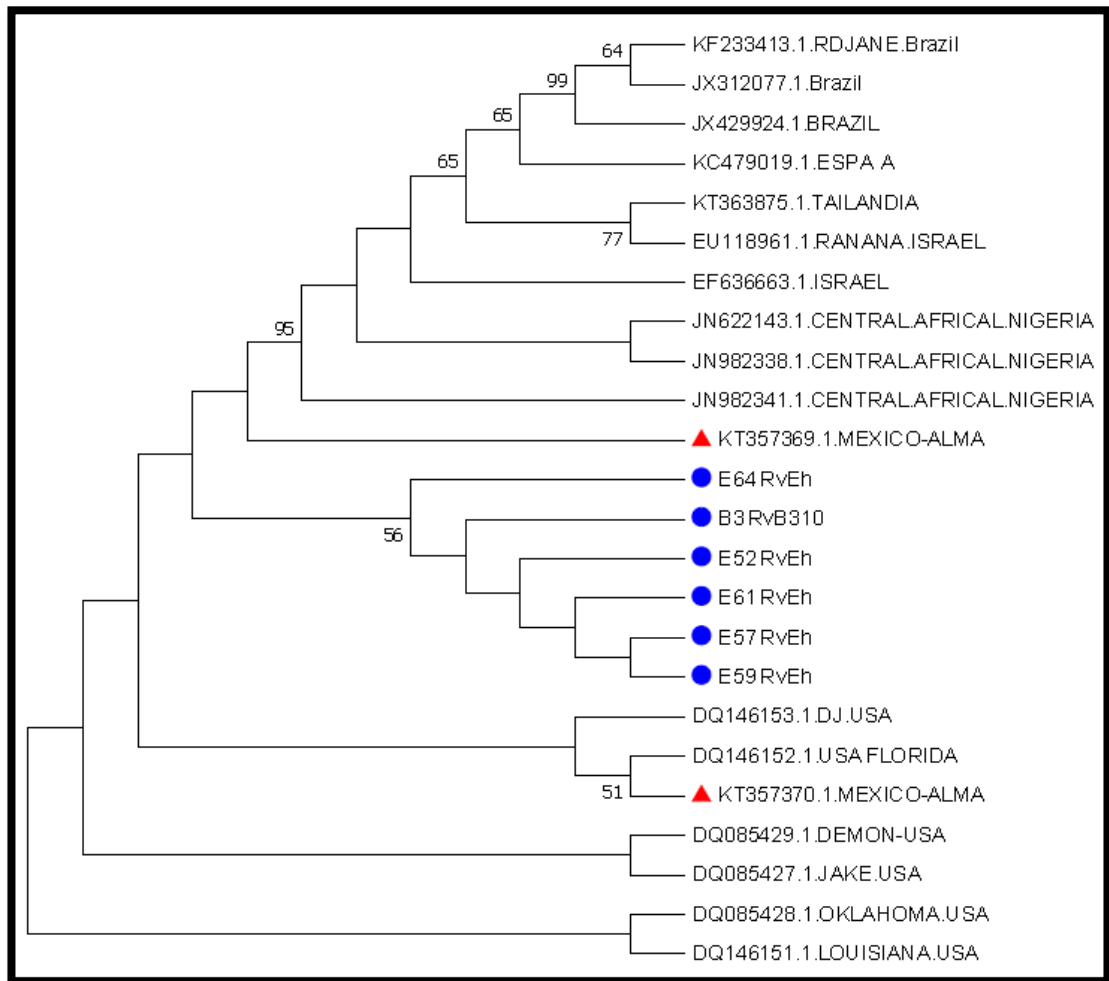


Fig. 25 Árbol filogenético realizado con secuencias nucleotídicas parciales del gen *gp36* de *Ehrlichia canis* de diferentes orígenes geográficos. El método de construcción fue Neighbor-Joining, usando 1000 Bootstrap como soporte estadístico de la topología. Las secuencias mexicanas obtenidas en este estudio se encuentran identificadas con un círculo azul y las obtenidas en otros estudios en México están identificadas con un triángulo rojo.

8.1.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico realizado para la detección de PCR de *E. canis* respecto a los grupos de estudio como edad, raza, sexo y región, sólo se encontró diferencia significativa entre las colonias de muestreo (región) ($P=0.010$), el resto de las características no hubo diferencias significativas ($P>0.05$).

La diferencia estadística fue entre las colonias 3 de Mayo y Villa Juárez (**cuadro 10 y figura 26**).

Cuadro 10 Frecuencias de animales positivos por PCR a *E. canis* entre colonias donde se realizó el muestreo en la Ciudad de Chihuahua.

Colonia	Frecuencia
3 de Mayo	14 ^a
Jardines de Oriente	5 ^{ab}
Villa Juárez	1 ^b

*Significativo $P=0.045$.

Las colonias con literales iguales poseen un promedio similar, entonces, las características que tienen literales diferentes sus promedios son diferentes entre si y la característica con ambas letras son iguales al resto.

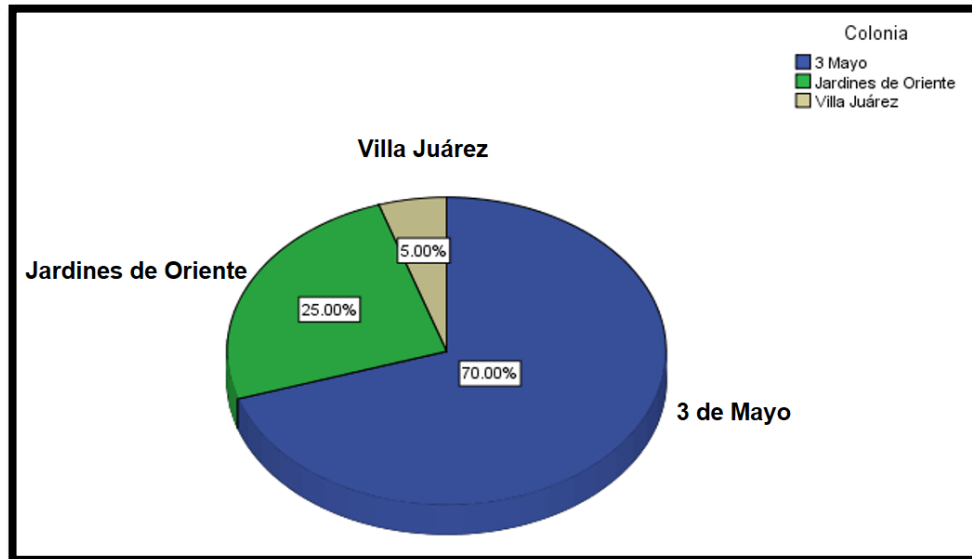


Fig. 26 Diagrama circular donde se muestran los porcentajes de animales positivos a la PCR de *E. canis* por colonia en la Ciudad de Chihuahua.

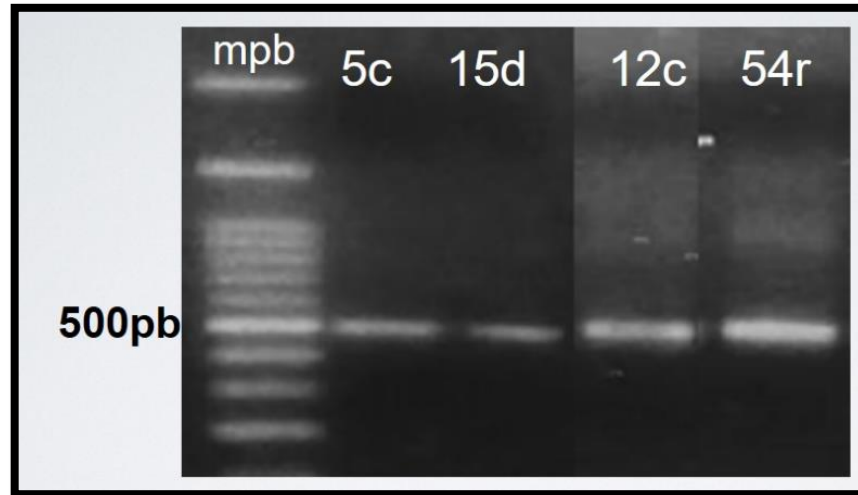
8.2 *Rickettsia rickettsii*

Después del análisis de varias secuencias disponibles en el GenBank se elaboraron dos parejas de iniciadores para amplificar un fragmento del gen *OmpA* de *Rickettsia rickettsii* por PCR (cuadro 11).

Cuadro 11 Iniciadores utilizados para la amplificación por PCR anidada de *R. rickettsii*.

Gen	Referencia	Secuencia	Producto	Tm (°C)
Fw1 ompA	Este estudio	GGCTAAAGTAACCGCACCTG	685pb	58.92
Rv1 ompA	Este estudio	CAAGACGTTTGGTGGAGCTC		59.13
Fw2.1 ompa	Este estudio	CAACACCGCTAACACTACCG	495pb	58.93
Rv2.1 ompa	Este estudio	TCAAAGGAGCGGGAGATTGT		59.02

El producto esperado de una amplificación positiva por PCR anidada para *Rickettsia rickettsii* fue de 495 pb, con esta técnica se lograron amplicones positivos en 4 de las 123 muestras evaluadas (**figura 27**). La frecuencia de infección por *R. rickettsii* en caninos de Chihuahua detectada por la PCR anidada fue del 3.2%.



mpb: marcador de pares de bases; pb: pares de bases; muestras positivas: 5c, 15d, 12c y 54r.

Fig. 27 Productos de amplificación por PCR de un fragmento del gen *ompA* de *Rickettsia rickettsii* separados por electroforesis en un gel de agarosa.

Para comprobar la especificidad de la PCR de *R. rickettsii* y realizar el análisis filogenético, se enviaron a secuenciar los productos obtenidos por el método Sanger (**figura 28**).

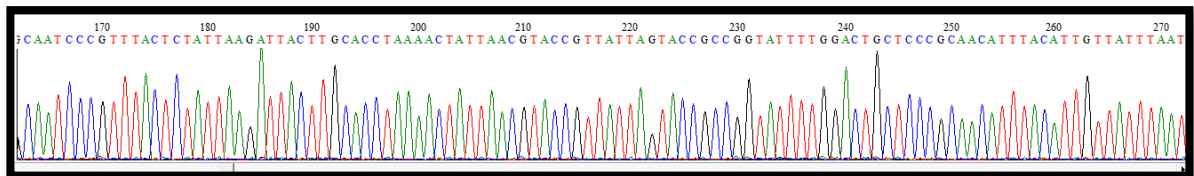


Fig. 28 Cromatograma de una secuencia nucleotídica de *R. rickettsii*.

El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas posterior a la secuenciación mostró una alta similitud (99%) entre las secuencias de *R. rickettsii* del estudio con secuencias disponibles en el GenBank utilizando el programa BLASTn (**figura 29**).

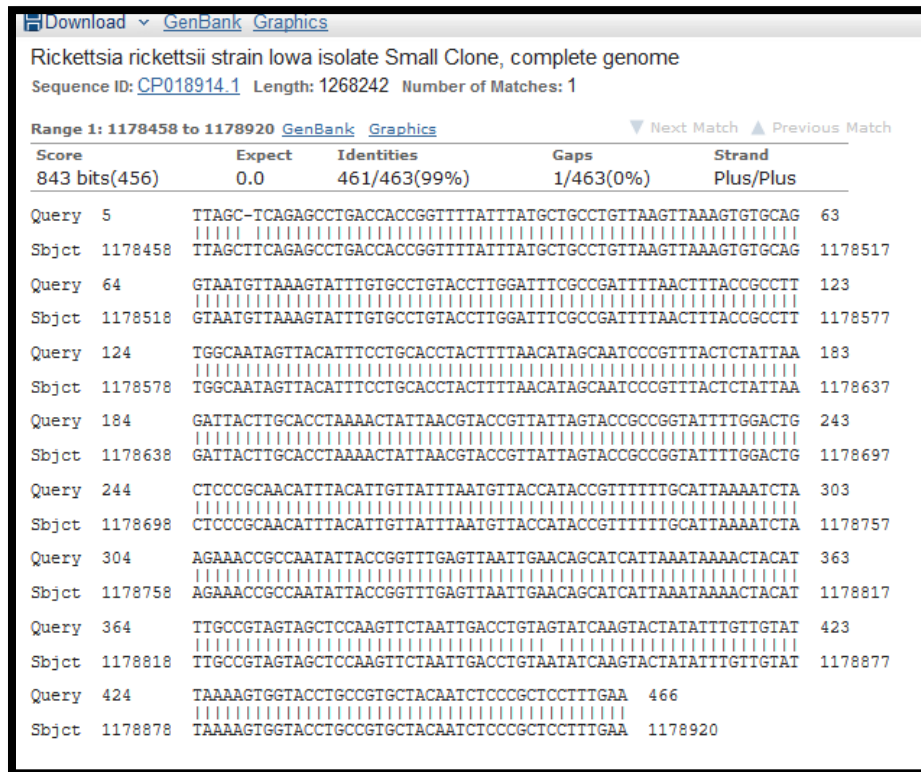


Fig. 29 Se muestra el BLASTn de una muestra secuenciada.

8.2.1. Muestras de sangre de caninos positivos a PCR de *R. rickettsii*.

Los resultados obtenidos por PCR para *R. rickettsii* se muestran por grupos de estudio (**cuadro12**). Los resultados por sexo fueron 3 machos y 1 hembra positivos, por raza 3 mestizos y uno de genética definida, en cuanto a la edad fueron 3 caninos menores a 24 meses y uno de 96 meses positivos.

Cuadro 12 Muestras positivas por PCR anidada que amplificó un fragmento del gen *ompA* de *R. rickettsii* a partir de leucocitos de sangre periférica de caninos.

Identificación	Edad (meses)	Sexo	Raza	PCR positivos
61c	24	Hembra	Mestizo	+
5c	12	Macho	Mestizo	+
12c	12	Macho	P. Alemán	+
15d	96	Macho	Mestizo	+

8.2.2 Análisis filogenético

Se construyó un árbol filogenético con secuencias nucleotídicas parciales del gen *ompA* de *R. rickettsii* obtenidas en el presente estudio, incluyendo otras secuencias disponibles en el GenBank de diferentes regiones.

La distribución de las secuencias del presente trabajo en el árbol filogenético, se intercalaron en diferentes ramas con secuencias obtenidas en diferentes trabajos en Estados Unidos.

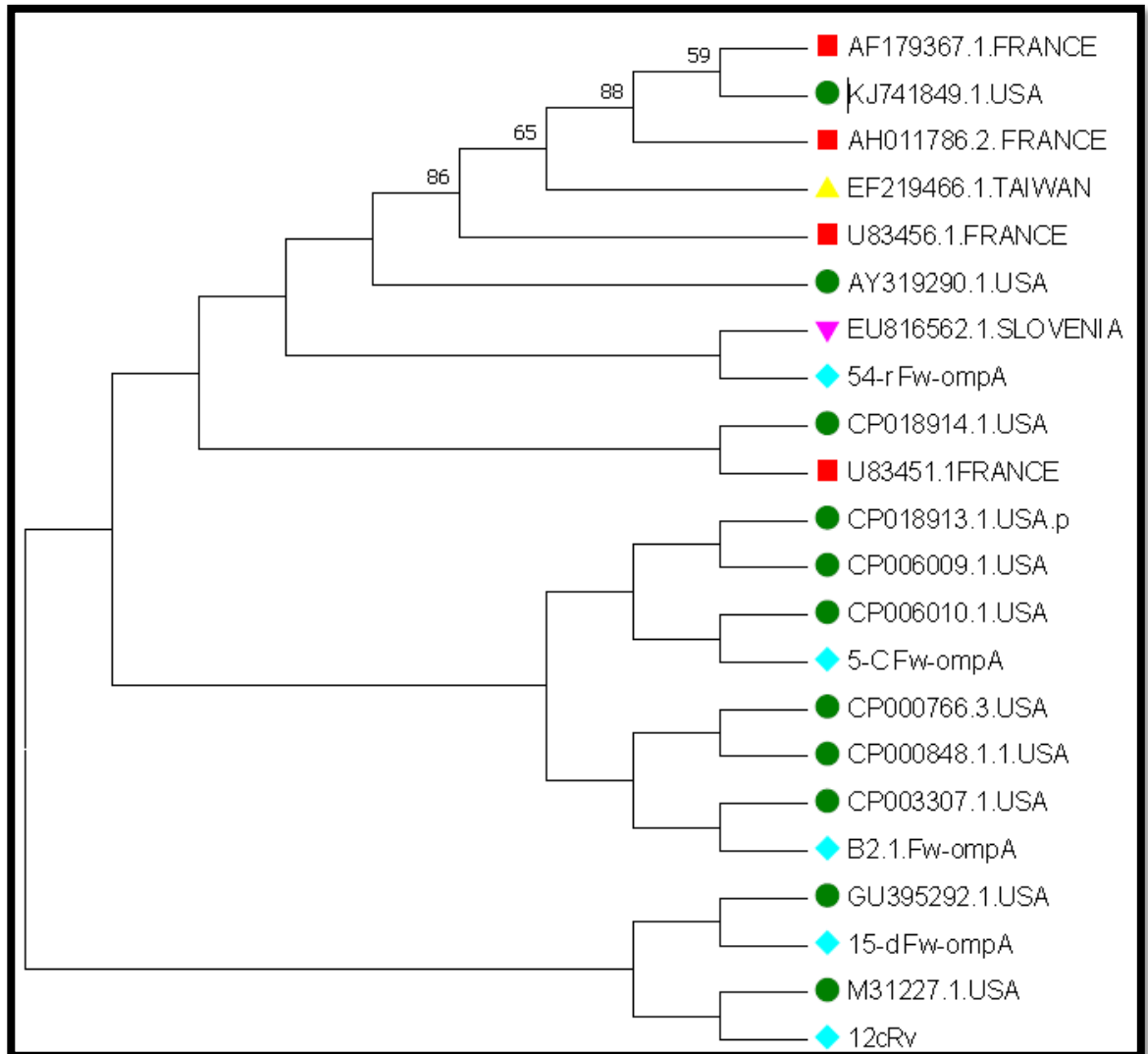


Fig. 30 Árbol filogenético realizado con secuencias nucleotídicas parciales del gen *ompA* de *Rickettsia rickettsii* de diferentes orígenes geográficos. El método de construcción fue Neighbor-Joining, usando 1000 Bootstrap como soporte estadístico de la topología. Las secuencias mexicanas obtenidas en este estudio se encuentran identificadas con un rombo azul.

Se realizó la deducción de las secuencias nucleotídicas generadas en el estudio a aminoácidos y se hicieron alineamientos de estas secuencias comparándolas con secuencias de referencia (**figura 31**).

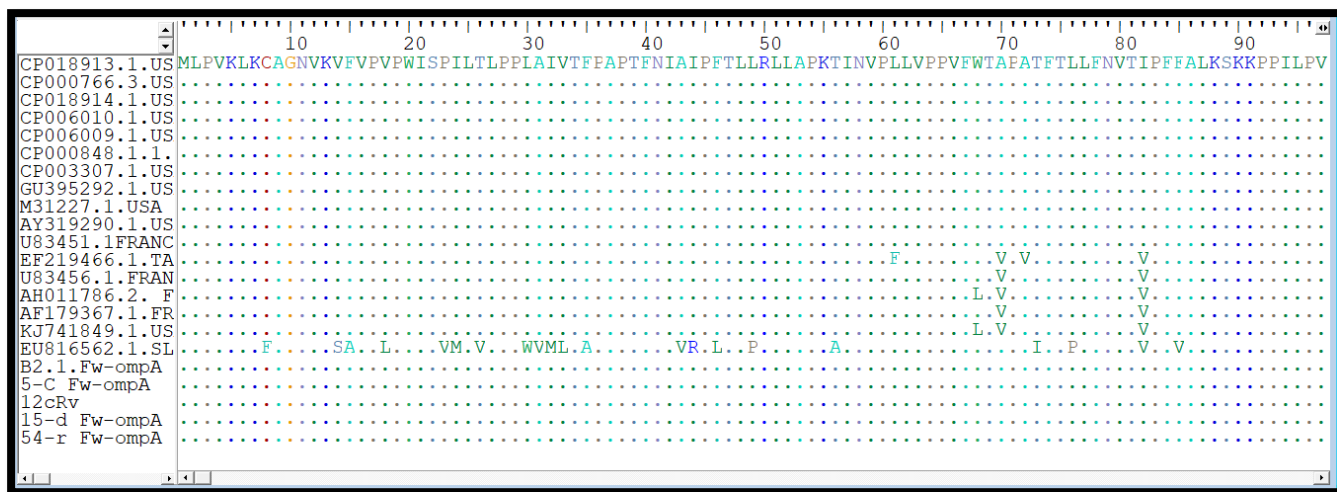


Fig. 31 Alineamiento de aminoácidos de la región genética *ompA* de *R. Rickettsii*. No se identificaron cambios en las secuencias proteicas mexicanas respecto a la mayoría de las secuencias generadas en Estados Unidos.

9. Discusión

9.1 *Ehrlichia canis*

La Erlichiosis Monocítica Canina es una enfermedad emergente en medicina veterinaria distribuida a nivel mundial transmitida por la mordedura de garrapatas (**Bulla et al., 2004**). Dado que las garrapatas pueden transmitir diferentes microorganismos, la identificación de estos, desde el punto de vista epidemiológico y de salud pública es importante (**Otranto et al., 2009**).

En este trabajo se logró la identificación de *E. canis* por PCR anidada en 20 de 123 (16.2%) muestras de ADN de leucocitos de sangre periférica de caninos de diferente edad, raza y sexo de la ciudad de Chihuahua. Algunos autores han documentado que en perros con estadios crónicos o infecciones persistentes, la bacteria tiene tropismo hacia bazo y médula ósea, por lo que es posible que al coleccionar muestras de sangre para el diagnóstico molecular se tengan resultados negativos (**Harrus et al 2011**). En el presente estudio fue posible detectar por PCR anidada en sangre de caninos la infección de *E. canis*, sin contar con información respecto a la fase clínica de los perros estudiados, no obstante, no se estableció si el grupo de estudio incluía un número alto de animales crónicos o persistentes que influenciaron en un alto porcentaje de animales negativos. Por otro lado, los trabajos que documentan prevalencias de la infección por *E. canis* en México son variables, encontrando prevalencias más altas que las identificadas en este estudio, como lo descrito por **Rodríguez et al.**, Ciudad Juárez, Chihuahua (2013) utilizando pruebas de inmunocromatografía de flujo lateral (IFL) y PCR anidada, logrando detectar la presencia de *E. canis* en el 61.5% (24/39) en sangre y bazo, 48.7% (19/39) en hígado y médula ósea y 12.8% (5/39) en linfonodos. En Yucatán **Pat-Nah et al., (2015)** muestrearon 50 caninos para realizar una PCR anidada dirigida al gen 16S ARNr, en donde el 36% de los perros fueron positivos a la infección por *Ehrlichia canis* en muestras de sangre. **Acevedo et al., (2016)** con una PCR anidada dirigida al gen 16S ARNr observaron 15/53 (28.3%)

muestras positivas a *E. canis* de sangre de cánidos de diferente edad, raza y sexo, provenientes de Colima, Veracruz, Ciudad de México y Estado de México. Otros estudios han reportado prevalencias bajas como en Torreón Coahuila donde **Almazán et al., (2016)** realizaron la primera identificación molecular de *E. canis* en la región, encontrando un 4% de positividad en 100 muestras de sangre de caninos. **Rojero en 2017** encontró en Campeche una prevalencia del 7% de *E. canis* en muestras de sangre de 44 caninos empleando una PCR anidada dirigida al gen *16S ARNr*. Solo se identificó un estudio que describe una prevalencia similar al presente trabajo realizado por **Beristain et al., (2013)** Ciudad Juárez, Chihuahua recolectando sangre de 50 perros en Ciudad Juárez seropositivos a *E. canis* con la prueba de IFL y la identificación molecular se realizó con PCR anidada a partir de ADN extraído de muestras de sangre colectadas antes y 30 días después de iniciado un tratamiento con doxiciclina (10mg/kg/24hr), encontrando que únicamente 7 muestras (14%) resultaron positivas previo a la aplicación del antibiótico, mientras que 10 (20%) del total de las muestras analizadas mostraron la presencia de ADN de *E. canis* después de finalizar el tratamiento. Como se puede percibir en los estudios anteriormente descritos en México existen muchas variables en cada trabajo realizado como: caninos tratados con antibióticos, detección de la bacteria en tejidos y sangre, técnica de detección utilizada, región geográfica estudiada y uno de las variables más importantes es el número de animales evaluados; debido a esto no es posible establecer prevalencias reales por regiones ni la eficacia de la PCR anidada diseñada en este estudio, no obstante, la técnica permitió la detección de un 16.2 % de caninos infectados por *E. canis*, en una zona donde no había reportes previos. Como varios estudios reportan la amplificación por PCR del gen *16S ARNr*, en este trabajo se diseñaron iniciadores para esta región logrando amplificaciones no específicas (datos no mostrados), por lo cual es altamente recomendado que los amplicones sean secuenciados, como se realizó en el presente estudio. En otros países también han encontrado resultados similares de prevalencia y del uso de la PCR como en: Brazil (Labruna *et al.*, 2007) presentan el primer reporte de la

infección de *Ehrlichia canis* en perros de la región la cual implica la técnica de PCR y el análisis de secuencias de los amplicones, 4 de 5 perros examinados fueron positivos. En Tailandia (Pinyoowong *et al.*, 2008) se detectó por PCR a nivel molecular la detección directa de *Ehrlichia canis* y el análisis de secuencias facilitó su comparación geográfica con diferentes cepas.

En Yucatán **Pat-Nah *et al.*, (2015)** reportaron caninos positivos por edad menores a 2 años 5/16 (31.2%), de 2-5 años 8/20 (40.0%) y mayores a 5 años 5/14 (35.7%); respecto al sexo los resultados fueron hembras 5/22 (22.7%) y machos 13/28 (46.4%) positivos a PCR. **Acevedo *et al.*, (2016)** encontraron en diferentes estados de México 10 machos y 3 hembras positivos a PCR anidada del gen 16S ARNr a partir de muestras de sangre, 11 perros de raza positivos, respecto a la edad los positivos fueron 11 menores a 3 años, 5 de 3 a 6 años y 4 mayores a 6 años. En Torreón Coahuila **Almazán *et al.*, (2016)** a partir de 100 muestras solo detectó 4 positivas por PCR del gen *gp36*, todas fueron en machos y de diferentes edades. En este estudio se encontraron 14.04% de machos y 18.18% de hembras positivas a la PCR anidada del gen *gp36*, en edad fueron en general animales jóvenes y en ambos grupos de animales de raza definida (17.78%) y mestizos (15.38%). Como previamente se comentó hay muchas variables en los diferentes estudios donde se pueden apreciar datos de positividad respecto a razas y edades, es importante resaltar que la mayoría de los trabajos diseñan su técnica de PCR para detectar el gen 16S ARNr y solo se identificó un trabajo realizado en el país que al igual que en este estudio estaba dirigido al gen *gp36*, en ambos estudios se secuenciaron los amplicones positivos, no así en varios de los estudios donde utilizan PCR dirigidas al gen 16S RNAr, por lo que no se conoce la especificidad en estos trabajos.

En el muestreo realizado en este estudio en todos los caninos se identificó visualmente la presencia de garrapatas del género *Rhipicephalus*, no obstante, de los 123 perros evaluados solo en 20 se detectó la presencia de *E. canis*. La identificación de *Rhipicephalus spp.* concuerda con lo previamente descrito por

Márquez et al., (2012) en la ciudad de Chihuahua, los cuales realizaron un trabajo entomológico recolectando un total de 196 ejemplares de garrapatas, en colonias cercanas a las incluidas en este estudio, todas las muestras de garrapatas obtenidas fueron del género *Rhipicephalus spp.* Otros trabajos identifican que el vector más importante en la transmisión de *E. canis* es *R. sanguineus* como los realizados en Yucatán (**Pat-Nah et al., 2015**), zona centro del país (**Cruz-Vázquez y García-Vázquez, 1999**) y zona norte (**Tinoco-Gracia et al., 2009**). En otros países también han asociado la transmisión de *E. canis* con la garrapata café, como en Brazil (**Da Silva et al., 2010**), Italia (**Dantas-Torres y Otranto, 2011**). Israel (**Warner y Harrus, 2000**), Reino Unido (**Walker et al., 2000**), Estados Unidos (**Kordick et al., 1999**).

El análisis filogenético realizado en el gen *gp36* muestra que las secuencias mexicanas obtenidas en este estudio se agruparon en un mismo clado, mostrando una mayor relación con otras secuencias mexicanas previamente reportadas (**Almazán et al., 2015**), y algunas secuencias (DQ146153.1, DQ146152.1) de Estados Unidos (**Doyle et al., 2005**).

Ristic y Holland (1993) reportaron que la presencia de mórulas en frotis sanguíneos es más eficaz en etapas agudas de la infección, por lo cual se dificulta observarlas en la etapa crónica. En Yucatán **Pat-Nah et al., (2015)** reportaron un 4% de muestras de sangre positivas a la presencia de mórulas. En este estudio se identificó solo en un frotis la presencia de mórulas y este canino fue negativo a PCR, lo que concuerda con otros estudios de que la observación de mórulas no son frecuentes y no pueden ser consideradas como elementos de diagnóstico rutinario.

Para las muestras que resultaron negativas en la PCR para la detección de *E. canis* se realizó la PCR del gen constitutivo *HPTR1* para verificar la integridad del ADN y así confirmar la negatividad. De las 100 muestras procesadas para PCR del

gen constitutivo *HPRT1* se encontraron 76 positivas y 24 muestras negativas. En contraste, en la mayoría de los estudios revisados y en los que se basan en el uso de la PCR no describen la detección de genes endógenos que verifiquen la integridad del ADN, siendo un aspecto importante para la comprobación de los verdaderos negativos.

Kordick en 1999 reporta Co-infecciones en caninos por *E. canis* y *R. rickettsii*, usando una PCR anidada para el gen *16S ARNr* en muestras de sangre. Adicionalmente se ha descrito que *R. sanguineus* es el vector principal de bacterias como: *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia coronii* y *Rickettsia rickettsii* (**Aparecida et al., 2010, Cristina et al., 2012, Fourie et al., 2013, Cicuttin et al., 2014 y Sosa-Gutiérrez et al., 2016**). En el presente trabajo, se encontró que la muestra 61c fue positiva a PCR para *E. canis* y *R. rickettsii*, confirmando lo que otros autores ya han demostrado. Resaltando la relevancia del diseño de técnicas que identifiquen más de un agente bacteriano.

En el análisis de aminoácidos en este trabajo se identificaron cambios no sinónimos, que incluyeron a: Alanina (A) por Aspártico (D), Asparagina (N) por Aspártico (D) e Histidina (H) por Tirosina (Y). Datos similares los reportan **Almazán et al., (2016)** en secuencias amplificadas del gen *gp36* de *E. canis* donde cambia la Serina (S) por Prolina (P) y la Prolina (P) por Treolina (T), no obstante, sus implicaciones biológicas no fueron dilucidadas.

9.2 *Rickettsia rickettsii*

En México, **Bustamante y Varela en 1953** demuestran la existencia de la Fiebre Manchada en los Estados de Sonora y Sinaloa. En la Comarca Lagunera, Coahuila (**Silva-Goytia y Elizondo, 1953**) realizan estudios por medio de fijación de complemento de sueros de ciertos animales domésticos para el diagnóstico de la Fiebre Manchada. Otros trabajos (**De Lara-Huerta y Cárdenas-Barragán, 2008**) realizan una revisión clínica de una serie de 115 casos en el Hospital Infantil Universitario de Torreón, Coahuila. En Yucatán **Zavala-Castro et al., (2008)** realizan pruebas de tipo serológico con la técnica de inmunofluorescencia indirecta y PCR para los genes *gltA* y el de la proteína de *17kd* a partir de muestras de sangre. Como se puede observar los trabajos en caninos son escasos, la mayor parte de ellos van enfocados a medicina humana. Este trabajo permitió detectar a *Rickettsia rickettsii* a nivel molecular en zonas endémicas, por lo que es un dato importante epidemiológicamente y de salud pública, que se debe considerar para seguir realizando monitoreos serológicos y correlacionarlos con otras pruebas.

En el presente estudio se obtuvieron 123 muestras de sangre periférica de caninos, encontrando un 3.2%(4/123) de animales infectados con *Rickettsia rickettsii*, utilizando una PCR anidada que amplifica un fragmento del gen *ompA*. Diferente a lo reportado en un estudio realizado en San Luis Río Colorado, Sonora (**Rosa y Rossana, 2017**) en donde obtuvieron muestras de sangre de caninos y emplearon la PCR para amplificar un fragmentos del gen *gltA*, reportando 17.53% de frecuencia de riquetsiosis en los animales muestreados de una zona urbana en condición de calle. En Yucatán **Zavala-Castro et al., (2006)**, reportaron el primer caso de *Rickettsia rickettsii* identificado en humanos, utilizando técnicas de inmunohistoquímica y PCR en muestras de tejido parafinizado como bazo, hígado,

pulmón y cerebro. En Coahuila y Durango **Latreille et al., (2017)** colectaron de manera directa 840 garrapatas hembras sobre 168 perros domésticos (cinco garrapatas por perro), para el análisis molecular se eligieron al azar 3 garrapatas por muestra para conformar 195 pools y extraer el ADN y amplificar por PCR un fragmento del gen *gltA*, encontrando frecuencias de infección del 3.13% hasta 6.9%. en diferentes colonias. En Mexicali, Baja California **Tinoco-Gracia et al., (2009)** obtuvieron sangre de 21 caninos para la detección molecular con una PCR anidada de un fragmento del gen *gltA*, obteniendo 14 caninos positivos. Los resultados obtenidos en la detección de *R. rickettsii* en garrapatas (**Latreille et al., 2017**) fueron muy similares a los logrados en el presente estudio, aunque el fragmento del gen detectado por la PCR fue diferente, por otro lado, en otros estudios muestran que la amplificación por PCR del gen *gltA* es mas eficiente que utilizando iniciadores para la amplificación del gen *ompA*. Esta comparativa no se realizó en el presente estudio por lo cual sería interesante realizarla.

Se ha descrito que *R. sanguineus* transmite a *R. rickettsii* en México como previamente lo han reportado en: Mexicali, Baja California (**Tinoco-Gracia, et al., 2009**), Sinaloa (**Gaxiola et al., 1997**) y Cuernavaca, Morelos (**Cruz-Vázquez y García-Vázquez, 1999**). En otros países también se ha documentado la importancia de *R. sanguineus* en la transmisión de la bacteria como en: Estados Unidos (**Nicholson et al., 2006**), Brazil (**Szabo et al., 2001, Labruna et al., 2011**) y Japón (**Shimada et al., 2003**).

Kidd en 2008, demostró que los ensayos en muestras de sangre con técnicas de PCR son variables para *R. rickettsii*, posiblemente por el bajo número de bacterias. **Walker en 1980 y Paddock en 2004**, recomiendan que las muestras para el diagnóstico de *R. rickettsii* sean recolectadas durante la etapa aguda, a partir de biopsias de lesiones cutáneas para inmunohistoquímica lo que mejoraría la sensibilidad de hasta 70%. Posiblemente la escasa presencia de bacterias en

sangre fueron un factor relevante en la baja detección por PCR en el presente estudio.

El análisis filogenético realizado con el producto de amplificación del gen *ompA* muestra que las secuencias mexicanas obtenidas en este estudio se agruparon en un mismo clado, mostrando una mayor relación con otras secuencias (CP018913.1, CP003307.1, GU395292.1, M31227.1) de Estados Unidos, lo que es lógico pensar dada la cercanía de las regiones geográficas (**Hacstadt et al., 2017, Johnson et al., 2012, Stromdahl et al., 2011, Anderson et al., 1990**).

En México la FMMR es una enfermedad reemergente, con una creciente incidencia y elevada letalidad (**Álvarez-Hernández et al., 2016**). Los casos en humanos se asocian a la presencia de *R. sanguineus* infestando caninos dentro de casa y en el medio ambiente (**Dantas-Torres, 2010**). Sus hospederos principales de *R. sanguineus* son los caninos y menos común en humanos (**Barbara, 2007**). Posiblemente la infección en caninos es más frecuente por el contacto directo con la garrapata, que en humanos (**Nicholson et al., 2010**). El que se haya detectado una baja frecuencia de *R. rickettsii* en caninos, no implica que no sea importante, con lo anterior es posible que si los caninos son eliminados, esto puede aumentar la incidencia en las personas.

10. Conclusiones

- Con la PCR anidada para amplificar un fragmento de los genes *gp36* y *ompA*, fue posible detectar ADN de *Ehrlichia canis* y *Rickettsia rickettsii* respectivamente en muestras de leucocitos de sangre periférica en caninos.
- La frecuencia de detección por PCR encontrada para *Ehrlichia canis* fue de 16.2% y para *Rickettsia rickettsii* de 3.2%.
- Se identificó co-infección entre *E. canis* y *R. rickettsii*, y la presencia de mórulas en frotis sanguíneos.
- Es el primer reporte de la detección molecular de *Ehrlichia canis* y *Rickettsia rickettsii* en caninos de la ciudad de Chihuahua.

11. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Day, M. J. (2011). One health: the importance of companion animal vector-borne diseases. *Parasit. Vectors*. BioMed Central Ltd, 4(1), p. 49. doi: 10.1186/1756-3305-4-49.
- 2.- Otranto, D., Dantas-Torres, F. and Breitschwerdt, E. B. (2009). Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends Parasitol.* 25(4):157-63. doi: 10.1016/j.pt.2009.01.003.
- 3.- Bustamante, J. G. y Pon, A. (2010). Actualización en la vigilancia epidemiológica de “Rickettsiosis” (Primera de Dos Partes). Boletín epidemiológico, DGEPI, SSA. 27(6). En línea <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2010/sem6/pdf/edit0610.pdf>.
- 4.- SSA. (2014). *Sistemas Especiales de Vigilancia Epidemiológica*. Chihuahua: Sistemas Especiales de Vigilancia Epidemiológica.
- 5.- SINAVE. (2012). *Aviso Epidemiológico Rickettsiosis: Incremento de Casos de Rickettsiosis En Coahuila*. D.F.: SINAVE.
- 6.- SINAVE. (2014). *Vigilancia Epidemiológica Semana 28*. D.F.: Boletín Epidemiológico SINAVE.
- 7.- Márquez, G., Martínez, E., Ramos, C., Zavala, J., Barrios, G. (2012). Factores de riesgo ambientales para la adquisición de rickettsiosis en población abierta de los Servicios de Salud en la ciudad de Chihuahua, Chihuahua.
- 8.- Cardoso, L., Tuna, J., Vieira, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Baneth, G. (2010). Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. *Vet. J.* 183(2):232–323. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.10.009.
- 9.- Dantas-Torres, F., Figueredo, L., Otranto, D. (2011). Seasonal variation in the effect of climate on the biology of *Rhipicephalus sanguineus* in southern Europe. *Parasitology.* 138(4): 527-536.
- 10.- Cruz-Vázquez, C. & García-Vázquez, Z. (1999). Seasonal distribution of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) on dogs in an urban area of Morelos, Mexico. *Exp. Appl. Acarol.* 23(3):277-280.

- 11.- Tinoco-Gracia, L., Quiroz-Romero, H., Quintero-Martínez, M., Rentería-Evangelista, T., González-Medina, Y., Barreras-Serrano, A., Hori-Oshima, S., Moro, M., Vinasco, J. (2009). Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs in a region on the Mexico-USA border. *Vet. Rec.* 10;164(2):59-61.
- 12.- Nuñez-Ochoa, L. (2003). Estudio de la seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en México. *AMMVEPE.* 14(3): 83-85.
- 13.- Rodríguez-Vivas, R. I., Albornoz, R. E. F., and Bolio, G. M. (2005). *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Vet. Parasitol.* 127(1):75-9.
- 14.- Harrus, S., Aroch, I., Lavy, E., Bark, H. (1997). Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *Vet. Rec.* 141(10):247–250.
- 15.- Dreher, U.M., De La Fuente, J., Hofmam-Lehmann, R., Meli, M.L., Pusterla, N., Kocan, K.M., Woldehiwet, Z., Braun, U., Regula, G., Straerk, K.D.C., Lutz, H. (2005). Serologic cross reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 12(10):1177–1183.
- 16.- Ferreira, R.F., Cerqueira, A.M.F., Pereira, A.M., Guimarães, C.M., Sá, A.G., Abreu, F.S., Massard, C.L., Almonsny, N.R.P. (2007). *Anaplasma platys* diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. *Intern J. Appl. Res. Vet. Med.* 5(3):113–119.
- 17.- Ewing, S. A. (1963). Observations of leukocytic inclusion bodies from dogs infected with *Babesia canis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 143:503–506.
- 18.- Murphy, G. L., Ewing, L.C., Whitworth, J.C., Fox and Kocan. (1998). A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet. Parasitol.* 79(4): 325–339.
- 19.- Raoult, D., P. Brouqui, and V. Roux. (1996). A new spotted-fever-group rickettsiosis. *Lancet.* 10;348(9024):412.
- 20.- Anderson, J. F. and Magnarelli, L. A. (2008). Biology of Ticks. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 22(2): 195–215. doi: 10.1016/j.idc.2007.12.006.
- 21.- Secretaría de Salud. (2013). Guía de práctica clínica SS-595-13 “Prevención, diagnóstico y tratamiento de la fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* en población pediátrica y adulta en el primer y segundo nivel de atención”. México: Secretaría de Salud, [consultado el 18 de junio de 2015]. Disponible en: <http://www.cenetec-difusion.com/CMGPC/SS-595-13/RR.pdf>

- 22.- Tinoco-Gracia, L., Quiroz-Romero, H., Quintero-Martínez, M.T., Rentería-Evangelista, T.B., González-Medina, Y., Barreras-Serrano, A., Hori-Oshima, S., Moro, M.H., Vinasco, J. (2009). Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs on a region of the Mexico-USA border. *Vet. Rec.* 164(2):59-61.
- 23.- Donatien, A., Lestoquard, F. (1936). *Rickettsia bovis*, nouvelle espece pathogene pour le boeuf. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 29: 1057–1061.
- 24.- Stich, R. W., Schaefer, J. J., Bremer, W. G., Needham, G. R., & Jittapalapong, S. (2008). Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. *Vet. Parasitol.* 158(4). 256–273. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.013>.
- 25.- Rar, V. and Golovljova, I. (2011). *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “Candidatus *Neoehrlichia*” bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect. Genet. Evol.* 11(8):1842–1861. doi: 10.1016/j.meegid.2011.09.019.
- 26.- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R. (2001). Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51(Pt6):2145–2165.
- 27.- de la Fuente, J., Kocan, K.M., Blouin, E.F., Zivkovic, Z., and Naranjo, V. (2010). Functional genomics and evolution of tick-*Anaplasma* interactions and vaccine development. *Vet. Parasitol.* 167(2-4):175–186. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.09.019.
- 28.- McDade, J.E. (1990). Ehrlichiosis a disease of animals and humans. *J. Infect. Dis.* 161(4):609–617.
- 29.- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., and Garcia-Garcia, J.C. (2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: *Anaplasmataceae*): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology.* 129 Suppl: S285–S300.
- 30.- Ismail, N., Bloch, K.C., and McBride, J.W. (2010). Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clin. Lab. Med.* 30(1):261–292.

- 31.- Dawson, J. E. & Ewing, S. A. (1992). Susceptibility of dogs to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, causative agent of human ehrlichiosis. *Am. J. Vet. Res.* 53(8). 1322–1327.
- 32.- Kakoma, I., Hansen, R.D., Anderson, B.E., Hanley, T.A., Sims, K.G., Liu, L., Bellamy, C., Long, M.T., Baek, B.K. (1994). Cultural, molecular, and immunological characterization of the etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 32(1): 170–175.
- 33.- Rikihisa, Y. (1991). Cross-reacting antigens between *Neorickettsia helminthoeca* and *Ehrlichia* species, shown by immunofluorescence and Western immunoblotting. *J. Clin. Microbiol.* 29(9): 2024–2029.
- 34.- Bremer, W.G., Schaefer, J.J., Wagner, E.R., Ewing, S.A., Rikihisa, Y., Needham, G.R., Jittapalapong, S., Moore, D.L., Stich, R.W. (2005). Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet. Parasitol.* 131(1-2): 95–105.
- 35.- Mavromatis, K., Doyle, C.K., Lykidis, A., Ivanova, N., Francino, M.P., Chain, P., Shin, M., Malfatti, S., Larimer, F., Copeland, A., Detter, J.C., Land, M., Richardson, P.M., Yu, X.J., Walker, D.H., McBride, J.W., Kyrpides, N.C. (2006). The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. *J. Bacteriol.* 188(11): 4015–4023.
- 36.- Doyle, C.K., Nethery, K.A., Popov, V.L., McBride, J.W. (2006). Differentially expressed and secreted major immunoreactive protein orthologs of *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis* elicit early antibody responses to epitopes on glycosylated tandem repeats. *Infect. Immun.* 74(1): 711–720.
- 37.- McBride, J.W., Corstvet, R.E., Gaunt, S.D., Boudreaux, C., Guedry, T., Walker, D.H. (2003). Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. *Infect. Immun.* 71(5): 2516–2524.
- 38.- McBride, J. W., J. E. Comer, and D. H. Walker. (2003). Novel immunoreactive glycoprotein orthologs of *Ehrlichia spp.* *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990:678–684.
- 39.- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Guglielmone, A.A., and Meléndez, R.D. (2003). Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(4):698–712. doi: 10.1128/CMR.16.4.698-712.2003

- 40.- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., and García-García, J.C. (2004) *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: *Anaplasmataceae*): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*. 129 Suppl: S285–300.
- 41.- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Coetzee, J.F., and Ewing, S.A. (2010a) The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* 167(2-4):95–107. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.09.012.
- 42.- Dantas-Torres, T.F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit. Vectors*. 3: 26. doi.org/10.1186/1756-3305-3-26.
- 43.- Sosa-Gutiérrez, C. G., Vargas-Sandoval, M., Torres, J., & Gordillo-Pérez, G. (2016). Original Article. 17(3). 353–360.
- 44.- Otranto, D., Dantas-Torres, F. and Breitschwerdt, E. B. (2009). Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. *Trends Parasitol.* 25(5), pp. 228–235. doi: 10.1016/j.pt.2009.02.005.
- 45.- Brenner, Don J., Krieg, Noel R., Staley, James T., Garrity, G.M. y Boone, David R. (2005). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Volume Two, The Proteobacteria, Part C, Second Edition*. Springer Verlag. New York. pp. 96, 98-103, 111-113.
- 46.- Groves, M.G., Dennis, G.L., Amyx, H.L., Huxsoll, D.L. (1975). Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by tick (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am. J. Vet. Res.* 36(7):937–940.
- 47.- Warner C. K y J. E. Dawson. (1996). *In: PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases* (Persing D.H. ed.). MBio. Washington, D.C. pp. 100-105.
- 48.- Waner T. y S. Harrus. (2004). Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME). *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2745-2749.
- 49.- Birtles, R. J. *et al.* (2016). Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol.* 17(2): 74-80. doi: 10.1016/S1471-4922(00)01856-0.
- 50.- Green, C. E. (2000). *Enfermedades Infecciosas en perros y gatos* (2ª ed). México: McGraw-Hill Interamericana.
- 51.- Willadsen, P. and Jongejan, F. (1999). Immunology of the tick–host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)*.

15(7): 258–262.

52.- Ferreira, B.R. and Silva, J.S. (1999). Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology*. 96(3): 434–439. doi: 10.1046/j.1365-2567.1999.00683.x.

53.- Labuda, M., Kozuch, O., Zuffová, E., Nuttall, P. (1997). Tick borne encephalitis virus transmission between ticks co-feeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology*. 235(1): 138–143.

54.- Straubinger, R.K., Summers, B., Chang, Y.F., Appel, A. (1997). Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *J. Clin. Microbiol.* 35(1): 111–116.

55.- Adachi, K., Yoshimoto, A., Hasegawa, T., Shimizu, T., Goto, Y., Makimura, S. (1992). Anti-erythrocyte membrane antibodies detected in sera of dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. *J. Vet. Med. Sci.* 54(6): 1081–1084.

56.- Grindem, C.B., Breitschwerdt, E.B., Perkins, P.C., Cullins, L.D., Thomas, T.J., Hegarty, B.C. (1999). Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35(1): 56–61.

57.- Baticados, A.M (2011). Serological Evidence for *Ehrlichia canis* Exposure in Military Dogs and Other Canines in Metropolitan Manila , Philippines. *ISR J. Vet. Med.* 66(4): 151–156.

58.- Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Quorollo, B.A., Saito, T.B., Maggi, R.G., Blanton, L.S., Bouyer, D.H. (2014). Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. *Parasit. Vectors*. 7:298. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-298>.

59.- Vinasco, J., Li, O., Alvarado, A., Diaz, D., Hoyos, L., Tabachi, L., Sirigireddy, K., Ferguson, C., Moro, M.H. (2007). Molecular evidence of a new strain of *Ehrlichia canis* from South America. *J. Clin. Microbiol.* 45(8): 2716–2719. doi: 10.1128/JCM.01102-07.

60.- Lakkawar, A. W., Nair, M. G., Varshney, K. C., Sreekrishnan, R., & Rao, V. N. (2003). Pathology of canine monocytic ehrlichiosis in a german shepherd dog. *Slov. Vet. Res.* 40(2), 119-128.

61.- Allison, R. W. and Little, S. E. (2013). Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Vet. Clin. Pathol.* 42(2): 127–144. doi: 10.1111/vcp.12040.

62.- <http://www.idexx.es/smallanimal/inhouse/snap-in-house-tests.html>

- 63.- Almazán, C., González-Álvarez, V. H., Fernández de Mera, I. G., Cabezas-Cruz, A., Rodríguez-Martínez, R., & de la Fuente, J. (2016). Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(2), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.11.002>.
- 64.- Fenollar F, R. (2004). Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *APMIS: Acta Pathologica Microbiologica, et Immunologica Scandinavica.* 112(11–12): 785–807. doi: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm11211-1206.x.
- 65.- Sparagano, O. A. E., Allsopp, M.T.E.P., Mank, R.A., Rijpkema, S.G.T., Figueroa, J.V. and Jongejan, F. (1999). Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: *Ixodidae*): a review. *Exp. Appl. Acarol.* 23(12):929–960.
- 66.- Greene (2015). *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* 4th Edition.
- 67.- Harrus, S., Waner, T., Bark, H., Jogejan, F., Cornelissen, A. (1999). Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 37(9): 2745–2749.
- 68.-Stephens, J. L. (2005). Tick-Borne Diseases of Humans. *Emerging Infect. Dis.* 11(11): 1808–1809. doi: 10.3201/eid1111.051160.
- 69.- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2006). Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis--United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. *MMWR Recomm. Rep.* 55(RR-4):1-27.
- 70.- Pérez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q., Rihihisa, Y. (2006). Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078:110–117.
- 71.- Gaff, H., Kocan, K. and Sonenshine, D. (2014). Tick-borne rickettsioses II (Anaplasmataceae). *Biology of ticks*, 2. Second edition.
- 72.- Mercado, M. C. (2010). Rickettsiosis. Historia y actualidades. *Enf. Inf. Microbiol.* 30;(1): 25-31.
- 73.- Bustamante, J. G. y Pon, A. (2010a). Actualización en la vigilancia epidemiológica de “Rickettsiosis” (Primera de Dos Partes). *Boletín epidemiológico*,

DGEPI, SSA. 27(6). En línea:
<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/284466/sem51.pdf>.

74.- Mahajan, S. K. (2012). Rickettsial Diseases. J. Assoc. Physicians India. 60: 37–44.

75.- Giménez, D. F. (1964). Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. Stain Technol. 39:135–140.

76.-Treadwell, T.A., Holman, R.C., Clarke, M.J., Krebs, J.W., Paddock, C.D., Childs, J.E. (2000). Rocky Mountain spotted fever in the United States, 1993-1996. Am. J. Trop. Med. Hyg. 63(1-2):21-26.

77.- Heinzen, R., Hayes, S., Peacock and Hackstad. (1993). Directional actin polymerization associated with spotted fever group rickettsia infection of Vero cells. Infect. Immun. 61(5):1926–1935.

78.- Teysseire, N., J. Boudier, and D. Raoult. (1995). *Rickettsia conorii* entry into vero cells. Infect. Immun. 63(1):366–374.

79.- Teysseire, N., C. Chiche-Portiche, and D. Raoult. (1992). Intracellular movements of *Rickettsia conorii* and *R. typhi* based on actin polymerization. Res. Microbiol. 143(9):821–829.

80.- Burgdorfer, W., R. L. Anacker, R. G. Bird, and D. S. Bertram. (1968). Intranuclear growth of *Rickettsia rickettsii*. J. Bacteriol. 96(4):1415–1418.

81.- http://eol.org/data_objects/3602455 fecha de consulta 19/2/2018.

82.- Walker, D. H. (2007). Rickettsiae and Rickettsial Infections: The Current State of Knowledge. Clin. Infect. Dis. 15;45 Suppl 1:S39–44.

83.- Barba, J. R. (2009). Fiebre manchada de las Montañas Rocosas. Rev. Mex. Patol. Clin. 56(3):193-208.

84.- Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U.C., Podowski, R. M., Näslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H. y Kurland, C.G. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. Nature. 12;396(6707):133-140.

85.- McLeod, M.P., Qin, X., Karpathy, S.E., Gioia, J., Highlander, S.K., Fox, George, E., McNeill, T.Z., Jiang, H., Muzny, D., Jacob, L.S., Hawes, A.C., Sodergren, E., Gill, R., Hume, J., Morgan, M., Fan, G., Amin, A.G., Gibbs, R.A., Hong, C., Yu, X.J., Walker, D.H. y Weinstock, G.M. (2004). Complete Genome

Sequence of *Rickettsia typhi* and Comparison with Sequences of Other *Rickettsiae*. J. Bacteriol. 186;(17):5842-5855.

86.- Roux, V., Rydkina, E., Ereemeeva, M. y Raoult, D. (1997). Citrate Synthase Gene Comparison, a New Tool for Phylogenetic Analysis, and Its Application for the *Rickettsiae*. Int. J. Syst. Bacteriol. 47;(2):252-261.

87.- Fournier P.E, Raoult D. (2009). Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia spp*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1166:1-11. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04528.x.

88.- Ereemeeva M.E. (2012). Molecular epidemiology of rickettsial diseases in North America. Ticks Tick Borne Dis. 3(5-6):332-7.

89.- Ereemeeva, M.E., Zambrano, M.L., Anaya, L., Beati, L., Karpathy, S.E., Santos-Silva, M.M., Salceda, B., Macbeth, D., Olguin, H., Dasch, G.A. y Alpuche, A.C. (2011). *Rickettsiarickettsii* in *Rhipicephalus* Ticks, Mexicali, Mexico. J. Med. Entomol. 48(2):418-421.

90.- NOM-032-SSA2-2010, Norma Oficial Mexicana para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector.

91.- Shaw, S.E., Day, M.J., Birtles, R.J., Breitschwerdt, E.B. (2001). Tick-borne infectious diseases of dogs. Trends Parasitol. 17(2):74–80.

92.- La Scola, B., Raoult, D. (1997). Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. J. Clin. Microbiol. 35(11):2715-27.

93.- da Silva Costa, L.F., Nunes, P.H., Soares, J.F., Bahia, L.M. y Camargo-Mathias, M.I. (2011). Distribution of *Rickettsia rickettsii* in ovary cells of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Parasit. Vectors. BioMed. Central. 4:222. doi: 10.1186/1756-3305-4-222.

94.- Anderson, J. F. y Magnarelli, L. A. (2008). Biology of Ticks. Infect. Dis. Clin. North. Am. 22(2):195-215, v. doi: 10.1016/j.idc.2007.12.006.

95.- Kaufman, W. R. (2010). Ticks: Physiological aspects with implications for pathogen transmission. Ticks Tick-Borne Dis. 1(1):11-22. doi: 10.1016/j.ttbdis.2009.12.001.

96.- Dantas-Torres, F. (2007). Rocky Mountain spotted fever. Lancet Infect. Dis.7(11):724-32.

- 97.- Moore J.J. (1911). Time Relationships of the Wood-Tick in the Transmission of Rocky Mountain Spotted Fever. *J. Infect. Dis.* 8(3):339-47.
- 98.-Thorner, A.R., Walker, D.H., Petri, W.A. Jr. (1998). Rocky Mountain Spotted Fever. *Clin. Infect. Dis.* 27(6):1353-9.
- 99.- Martínez, J.J., Seveau, S., Veiga, E., Matsuyama, S., Cossart, P. (2005). Ku70, a component of DNA-dependent protein kinase, is a mammalian receptor for *Rickettsia conorii*. *Cell.* 123(6):1013–23.
- 100.- Gouin, E., Egile, C., Dehoux, P., Villiers, V., Adams, J., Gertler, F., Li, R., Cossart, P. (2004). The RickA protein of *Rickettsia conorii* activates the Arp2/3 complex. *Nature.* 427(6923):457–61.
- 101.- Jeng, R.L., Goley, E.d., D'Alessio, J.A., Chaga, O.Y., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Heinzen, R.A., Welch, M.D. (2004). A *Rickettsia* WASP-like protein activates the Arp2/3 complex and mediates actin-based motility. *Cell. Microbiol.* 6(8):761–9.
- 102.- Mansueto, P., Vitale, G., Cascio, A., Seidita, A., Pepe, I., Carroccio, A., di Rosa, S., Rini, G.B., Cillari, E. y Walker, D.H. (2012). New Insight into Immunity and Immunopathology of Rickettsial Diseases. *Clin. Dev. Immunol.* Article ID 967852, 26 pages. doi:10.1155/2012/967852.
- 103.- Riley, S.P., Goh, K.C., Hermanas, T.M., Cardwell, M., Chan, Y. G., y Martinez, J.J. (2010). The *Rickettsia conorii* Autotransporter Protein Sca1 Promotes Adherence to Nonphagocytic Mammalian Cells. *Infect. Immun.* 78;(5):1895- 1904.
- 104.- Walker, D.H. & Ismail, N. (2008). Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. *Nat. Rev. Microbiol.* 6(5):375-386. doi:10.1038/nrmicro1866.
- 105.- Whitworth, T., Popov, V.L., Yu, X.J., Walker, D.H., Bouyer, D.H. (2005). Expression of the *Rickettsia prowazekii* *pld* or *tlyC* gene in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* mediates phagosomal escape. *Infect. Immun.* 73(10):6668–73.
- 106.- Raoult, D. and Roux, V. (1997). Rickettsioses as Paradigms of New or Emerging Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 10(4):694–719.
- 107.- Valbuena, G., Walker, D.H. (2005). Changes in the adherens junctions of human endothelial cells infected with spotted fever group rickettsiae. *Virchows Arch.* 446(4):379–82.

- 108.- Rydkina, E., Sahni, S.K., Santucci, L.A., Turpin, L.C., Baggs, R.B., Silverman, D.J. (2004). Selective modulation of antioxidant enzyme activities in host tissues during *Rickettsia conorii* infection. *Microb. Pathog.* 36(6):293–301.
- 109.-Joshi, S.G., Francis, C.W., Silverman, D.J., Sahni, S.K. (2004). NF- κ B activation suppresses host cell apoptosis during *Rickettsia rickettsii* infection via regulatory effects on intracellular localization of levels of apoptogenic and anti-apoptotic proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 15;234(2):333–41.
- 110.- Grindem, C.B., Breitschwerdt, E.B., Perkins, P.C., Cullins, L.D., Thomas, T.J., Hegarty, B.C. (1999). Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35(1):56–61.
- 111.- Valbuena, G., Feng, H.M., Walker, D.H. (2002). Mechanisms of immunity against rickettsiae: new perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasite. *Microbes Infect.* 4(6):625–33.
- 112.- Feng, H.M., Whitworth, T., Popov, V., Walker, D.H. (2004). Effect of antibody on the rickettsia-host cell interaction. *Infect. Immun.* 72(6):3524–30.
- 113.-Feng, H.M., Whitworth, T., Olano, J.P., Vsevolod, L., Walker, D.H. (2004). Fc-dependent polyclonal antibodies and antibodies to outer membrane proteins A and B, but not to lipopolysaccharide, protect SCID mice against fatal *Rickettsia conorii* infection. *Infect. Immun.* 72(4):2222–2228. doi: 10.1128/IAI.72.4.2222-2228.2004.
- 114.- Chen, L.F., Sexton, D.J. (2008). What's new in Rocky Mountain spotted fever? *Infect. Dis. Clin. North Am.* 22(3):415-432, vii-viii. doi: 10.1016/j.idc.2008.03.008.
- 115.- Milagres, B.S., Padilha, A.F., Barcelos, R.M., Gomes, G.G., Montandon, C.E., Pena, D.C, Nieri-Bastos, F.A., Silveira, I., Pacheco, R., Labruna, M.B., Bouyer, D.H., Freitas, R.N., Walker, D.H., Mafra, C.L., Galvao, M.A. (2010). *Rickettsia* in synanthropic and domestic animals and their hosts from two areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the eastern region of Minas Gerais, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83(6):1305-7. doi: 10.4269/ajtmh.2010.10-0239.
- 116.- Nicholson, W.L., Allen, K.E., McQuiston, J.H., Breitschwerdt, E.B., Little, S.E. (2010). The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends Parasitol.* 26(4):205-12. doi: 10.1016/j.pt.2010.01.007.

- 117.- Ober, C.P., Spaulding, K., Breitschwerdt, E.B., Malarkey, D.E., Hegarty, B.C. (2004). Orchitis in two dogs with Rocky Mountain spotted fever. *Vet Radiol Ultrasound*. 45(5):458-65.
- 118.- Mikszewski, J.S, Vite, C.H. (2005). Central nervous system dysfunction associated with Rocky Mountain spotted fever infection in five dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 41(4):259-66.
- 119.- Chapman, A.S., Bakken, J.S., Folk, S.M., Paddock, C.D., Bloch, K.C., Krusell, A., Sexton, D.J., Buckingham, S.C., Marshall, G.S., Storch, G.A., Dasch, G.A., McQuiston, J.H., Swerdlow, D.L., Dumler, S.J., Nicholson, W.L., Walker, D.H., Eremeeva, M.E., Ohl, C.A. (2006). Diagnosis and management of tick- borne rickettsial diseases: rocky mountain spotted fever, Ehrlichiosis, and Anaplasmosis- United States. *A Practical Guide for Health Care and Public Health Professionals. Morbidity and Mortality Weekly Report*. 65(2):1–44.
- 120.-Raoult, D., Paddock, C.D. (2005). *Rickettsia parkeri* infection and other spotted fevers in the United States. *N. Engl. J. Med.* 353(6):626–7.
- 121.-Walker, D.H. (1995). Rocky Mountain spotted fever: a seasonal alert. *Clin. Infect. Dis.* 20(5):1111–7.
- 122.-Centers for Disease Control and Prevention. (2012). In depth information Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF). Available: <https://www.cdc.gov/rmsf/index.html>. Access: June 19.
- 123.- Hun-Opfer, L. (2008). Las fiebres manchadas y su importancia en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*. 50 (2):77-86.
- 124.- Pickering, L. K. (2000). *Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases*. 29th Edition. American Academy of Pediatrics. https://redbook.solutions.aap.org/DocumentLibrary/RB12_interior.pdf.
- 125.- Godorezky, C. (2009). *Manual de Técnicas XIII. Curso teorico-práctico de genética molecular*. Departamento de inmunogenética del INDRE, Sector Salud. México.
- 126.- <https://ibm-spss-statistics-base.uptodown.com/windows>.
- 127.- Coughlin, S.S., Trock, B., Criqui, M.H., (1992). The logistic Modeling of sensitivity, specificity and predictive value of a diagnostic test. *J. Clin. Epidemiol.* 45(1): 1-7.

128.- Ramos, S.L. (2016). Estandarización e implementación de una técnica de PCR en Tiempo Real para la determinación de la carga viral de Circovirus Porcino Tipo 2(PCV2) en corazones fetales procedentes de falla reproductiva en cerdas.
Tesis de Licenciatura. FESC.UNAM

12. ANEXO 1

SOLUCIONES

Solución de lisis I

- ✓ MgCl_2 5mM cbp 1L H_2O desionizada

Peso molecular de MgCl_2 : 95.21 g/mol/1,000:0.09521 g/mM 0.09521 g/mol X 5:
0.476g MgCl_2 .

Solución de lisis II

- ✓ MgCl_2 5mM cbp 1L H_2O desionizada

Peso molecular de MgCl_2 : 95.21 g/mol/1,000:0.09521 g/mM 0.09521 g/mol X 5:
0.476g MgCl_2 .

- ✓ Nonidet (NP-40) al 0.1% cbp 1L H_2O desionizada.

1ml de Nonidet (NP-40) más 999 ml H_2O desionizada.

TAE 50X para 1L

- ✓ 242g TRIS base (pM 121.1).
- ✓ 57.1 mL ácido acético glacial.
- ✓ 10 mL 0.5M EDTA (pM 372.24) pH 8.0.
cbp. 1L

TAE 1X para 1L

20 mL de TAE 50X en 980 mL

Separación de Leucocitos de Sangre Periférica

- 1. Las células blancas se recuperaron con pipeta Pasteur y se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL.**
- 2. Agregar solución de lisis I cbp 10 mL y homogenizar.**
- 3. Centrifugar a 2,000 rpm por 5 minutos y decantar el sobrenadante.**
- 4. Agregar solución de lisis II cbp 10mL y homogenizar.**
- 5. Centrifugar a 2,000 rpm por 5 minutos y decantar el sobrenadante.**
- 6. Lavar con PBS a un volumen de 7 mL.**
- 7. Centrifugar a 2,000 rpm por 5 minutos y decantar el sobrenadante.**
- 8. Recuperar el paquete de células con micropipeta a un volumen de 300 μ L de PBS y guardar a -20°C hasta su utilización.**

TINCIÓN

Preparación del colorante de Wright-Giemsa

- 1.- Moler 300gr de colorante de Wright pulverizado y 30 gr de colorante de Giemsa pulverizado en un mortero con 100ml de alcohol metílico absoluto.**
- 2.- Dejar reposar el colorante durante 24 a 48 horas; filtre y úselo.**